

Schaltverhalten einzelner homo- und heterotetramerer olfaktorischer CNG-Kanäle

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biologin Melanie Eberhard

geb. am 30.04.1982 in Erfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Klaus Benndorf (Institut für Herz-Kreislauf-Physiologie Jena)
2. Prof. Dr. Ingo Dahse (Institut für Biochemie und Biophysik Jena)
3. Prof. Dr. Erich Wettwer (Institut für Pharmakologie und Toxikologie Dresden)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.03.2012

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Klaus Benndorf, Prof. Dr. Ingo Dahse, Dr. Ralf Schmauder, Dr. Jana Kusch

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfungen eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 16.03.2012

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Ionenkanäle.....	1
1.2 durch zyklisch Nukleotide aktivierte Ionenkanäle.....	1
1.2.1 Struktur der CNG-Kanäle.....	2
1.2.2 Physiologische Bedeutung.....	4
1.2.3 CNG-Kanäle des olfaktorischen Systems.....	5
1.2.4 Funktionelle Eigenschaften des olfaktorischen CNG-Kanals.....	7
2. Ziele der Arbeit.....	10
3. Material und Methoden.....	11
3.1 Zellkultur und molekularbiologische Methoden.....	11
3.1.1 Oozytenpräparation.....	11
3.2 Elektrophysiologie.....	12
3.2.1 Pipettenherstellung.....	12
3.2.2 <i>Patch-Clamp</i> -Technik.....	12
3.2.3 Messaufbau.....	13
3.3 Datenerfassung.....	15
3.4 Lösungen.....	15
3.5 Datenanalyse.....	16
3.5.1 Makroskopische Ströme.....	16
3.5.1.1 Erstellung einer Konzentration-Wirkungs-Beziehung.....	16
3.5.2 Einzelkanalströme.....	18
3.5.2.2 Erstellen von Amplituden-Histogrammen.....	18
3.5.2.1 Erstellen einer Konzentration-Wirkungs-Beziehung.....	18
3.5.2.3 Offen- und Geschlossenzeit-Histogramme.....	19
3.5.2.4 Modellierung der Einzelkanaldaten.....	20
3.5.2.5 Analyse der Rauschereignisse.....	21
4. Ergebnisse.....	24
4.1 Der homotetramere CNG-Kanal (CNGA2).....	24
4.1.1 Einzelkanalstrom.....	26
4.1.2 Konzentration-Wirkungs-Beziehung.....	28
4.1.3 Offenzeiten.....	31
4.1.4 Geschlossenzeiten.....	34
4.1.5 Beziehung zwischen aufeinanderfolgenden Offenzeiten und.....	37
Geschlossenzeiten.....	37

4.1.6 Modellierung des homotetrameren CNGA2-Kanals	40
4.1.7 Aktivität des Kanals über den Verlauf der Zeit	52
4.1.8 <i>Gating</i> -Modi des homotetrameren CNGA2-Kanals	53
4.2 Der heterotetramere CNG-Kanal	55
4.2.1 Einzelkanalstrom	58
4.2.2 Konzentration-Wirkungs-Beziehung	60
4.2.3 Offenzeiten	63
4.2.4 Geschlossenzeiten	65
4.2.5 Stromamplitude im heterotetrameren Einzelkanal	67
4.2.6 Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken des Einzelkanals	69
5. Diskussion	71
5.1 Der homotetramere CNG-Kanal (CNGA2)	71
5.1.1 Konzentration-Wirkungs-Beziehung	71
5.1.2 Offen- und Geschlossenzeiten	72
5.1.3 Reversibilität des Systems	74
5.1.4 Modellierung des homotetrameren CNGA2-Kanals	75
5.1.5 Charakterisierung der <i>Gating</i> -Modi	76
5.2 Der heterotetramere olfaktorische CNG-Kanal	77
5.2.1 Offen- und Geschlossenzeiten	78
5.2.2 Modellierung des heterotetrameren CNG-Kanals	79
5.2.3 Charakterisierung der Nadeln des heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanals	79
5.2.4 Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken	80
6. Schlussfolgerung	83
7. Zusammenfassung	85
8. Literaturverzeichnis	87

1. Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind allosterische Proteine, welche Ionen in die Zelle hinein oder aus ihr heraus leiten und dieser somit erlauben, ihr Membranpotential zu regulieren. Der Vorgang des sogenannten "*Gating*", also des Öffnens und Schließens der Pore, kann durch Spannungsänderungen, Bindung von Liganden oder durch Änderung der Oberflächendehnung der Membran, somit mechanisch verursacht werden.

1.2 durch zyklisch Nukleotide aktivierte Ionenkanäle

Durch zyklisch Nukleotide gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle = „*cyclic nucleotide gated channels*“) spielen eine tragende Rolle in vielfältigen physiologischen Prozessen. So sind sie zum Beispiel für die Generierung der primären elektrischen Signale in Photorezeptoren und olfaktorischen Sensorneuronen verantwortlich (Steyer, 1986; Yau und Baylor, 1989; Zagotta und Siegelbaum, 1996; Schild und Restrepo, 1998; Frings, 2001; Kaupp und Seifert, 2002). Aber auch in anderen sensorischen Zellen, wie Geschmacks- oder Tastrezeptoren, sowie in nichtsensorischen Geweben, wie Hippocampus, Herz, Niere, Bauchspeicheldrüse, Nebennieren oder Darm, werden diese Kanäle exprimiert (Ahmad *et al.*, 1990; Di Francesco und Tortora, 1991; Biel *et al.*, 1993, 1994; Distler *et al.*, 1994; Marunaka *et al.*, 1991; Weyand *et al.*, 1994; Zagotta und Siegelbaum, 1996; Richards und Gordon, 2000; Kaupp und Seifert, 2002). In diesen Geweben sind die Aufgaben der CNG-Kanäle jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die CNG-Kanäle wurden Mitte der 80er Jahre entdeckt (Fesenko *et al.*, 1985; Koch und Kaupp, 1985; Yau und Nakatani, 1985), als man herausfand, dass die visuelle Überleitung in retinalen Photorezeptoren durch direkte Bindung von zyklischen Guanosin 3',5' Monophosphat (cGMP) aktiviert wird (Fesenko *et al.*, 1985; Nakamura und Gold, 1987; Finn *et al.*, 1996; Zagotta und Siegelbaum, 1996). Zuvor nahm man an, dass zyklische Nukleotide über die Aktivierung von Proteinkinasen und damit durch Phosphorylierung der Ionenkanäle deren Funktion beeinflussen.

Die Aktivierung der CNG-Kanäle ist von der Konzentration des aktivierenden Liganden abhängig.

Obwohl cGMP als auch cAMP physiologische Liganden des CNG-Kanals darstellen, unterscheiden die CNG-Kanäle des retinalen Systems in den Zapfen und Stäbchen sehr stark zwischen diesen beiden Liganden, während die CNG-Kanäle der olfaktorischen Sensorneurone keinen wesentlichen Unterschied zwischen ihnen aufzeigen (Nakamura und Gold, 1987; Frings *et al.*, 1992; Kurahasi und Kaneko, 1993; Goulding *et al.*, 1992, 1994; Varnum *et al.*, 1995; Finn *et al.*, 1996; Kaupp und Seifert, 2002). Keiner der bisher untersuchten CNG-Kanäle zeigt eine Densensitisierung, auch wenn sie dem aktivierenden Ligand dauerhaft ausgesetzt sind (Bradley *et al.*, 2005). Der Ligand wird mittels verschiedener polarer und nichtpolarer Interaktionen an die Bindestelle gebunden. Dabei interagiert der Phosphatrest und der Ribosering des zyklischen Nukleotides, über eine Vielzahl an Wasserstoffbrückenbindungen mit der Bindestelle des Kanalproteins (Weber *et al.*, 1989; Altenhofen *et al.*, 1991; Scott *et al.*, 1995, 1996, 1998, 2000; Varnum *et al.*, 1995; Tibbs *et al.*, 1998; Kaupp und Seifert, 2002).

CNG-Kanäle unterscheiden nur schwach zwischen den Kationen, die die Pore passieren können (Nakatani und Yau, 1989; Kurahashi, 1989; Kolesnikov *et al.*, 1990; Kurahashi und Shibuya, 1990; Perry und McNaughton, 1991; Frings *et al.*, 1992; Picones und Korenbrot, 1992; Goulding *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1994; Frings *et al.*, 1995; Haynes, 1995; Picones und Korenbrot, 1995; Dzeja *et al.*, 1999; Kaupp und Seifert, 2002). Auch zweiwertige Kationen, wie beispielsweise Ca^{2+} , gelangen durch den geöffneten Kanal in die Zelle (Yau und Baylor, 1989; Kolesnikov *et al.*, 1990; Finn *et al.*, 1996).

1.2.1 Struktur der CNG-Kanäle

Strukturell gehören CNG-Kanäle der Superfamilie spannungsgesteuerter Kationenkanäle an. Sie sind tetramere Proteine, deren Untereinheiten sich um eine zentrale Pore anordnen (Liu *et al.*, 1996; Kaupp und Seifert, 2002). Jede Untereinheit besitzt sechs transmembranäre Segmente sowie einen intrazellulär gelegenen N- und C-Terminus (Jan und Jan, 1990; Heginbotham *et al.*, 1992; Henn *et al.*, 1995; Kaupp und Seifert, 2002; Craven und Zagotta, 2006). Das vierte transmembranäre Segment (S4) besitzt mehrere positiv geladene Aminosäuren und kann allgemein als Spannungssensor fungieren (Jan und Jan, 1990). Die Porenregion umfasst das fünfte und das sechste transmembranäre Segment und die dazwischenliegende Porenschleife (Goulding *et al.*, 1992; Bönigk *et al.*, 1993). Der intrazelluläre N-Terminus kann in einigen Untereinheiten durch Calmodulin in seiner

Funktion beeinflusst werden (Liu *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1994; Chen und Yau, 1994; Varnum und Zagotta, 1997; Weitz *et al.*, 1998). Der ebenfalls intrazellulär gelegene C-terminale Teil beinhaltet eine Liganden-bindende Domäne, die „cyclic nucleotide-binding domain“ (CNBD) (Kaupp *et al.*, 1989; Dhallan *et al.*, 1990; Ludwig *et al.*, 1990; Goulding *et al.*, 1992). Sie ist durch den C-Linker mit dem sechsten transmembranären Segment verbunden. Die Region des C-Terminus, welche sich nach der CNBD anschließt, die sogenannte post-CNBD Region, ist besonders für die Anordnung der Untereinheiten des CNG-Kanals von Bedeutung (Abb.1).

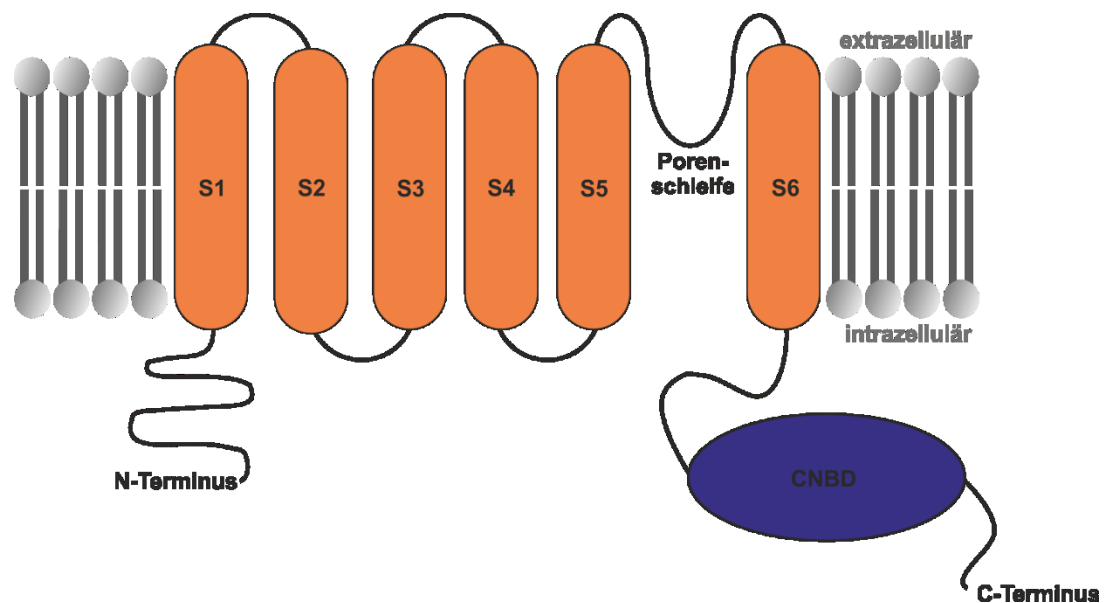


Abb.1: Schema einer CNG-Untereinheit. S1 bis S6 bezeichnet die sechs transmembranären Segmente. N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Zwischen dem fünften und dem sechsten transmembranären Segment befindet sich die Porenschleife, aus der sich in einem Komplex aus allen vier Untereinheiten die Pore zusammensetzt. An das sechste transmembranäre Segment schließt sich, durch den C-Linker verbunden, die Bindedomäne für zyklische Nukleotide (CNBD) an.

Native CNG-Kanäle sind Heterotetramere aus zwei oder drei verschiedenen Untereinheiten (Cook *et al.*, 1987; Moldey *et al.*, 1990; Bradley *et al.*, 1994; Liman und Buck, 1994; Körschen *et al.*, 1995; Finn *et al.*, 1998; Bönigk *et al.*, 1999; Lynch, 1999). Es sind sechs verschiedene vertebate CNG-Untereinheiten bekannt. Diese sind CNGA1, CNGA2, CNGA3, CNGA4, CNGB1 und CNGB3 (Kaupp *et al.*, 1989; Dhallan *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1993; Bönigk *et al.*, 1993; Bradley *et al.*, 1994; Liman und Buck, 1994; Ludwig *et al.*, 1990; Körschen *et al.*, 1995; Gerstner *et al.*, 2000; Bradley *et al.*, 2001). Drei dieser Untereinheiten (CNGA1, CNGA2 und CNGA3) können allein funktionelle homotetramere

Kanäle bilden, wenn sie in heterologen Systemen exprimiert werden (Dhallan *et al.*, 1990; Ludwig *et al.*, 1990; Goulding *et al.*, 1992; Gordon *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Bönigk *et al.*, 1999). Die restlichen Untereinheiten, CNGA4, CNGB1 und CNGB3, können in Kombination mit den drei zuvor erwähnten Untereinheiten (CNGA1, CNGA2 und CNGA3) funktionelle heterotetramere Kanäle bilden (Chen *et al.*, 1993, 1994; Bradley *et al.*, 1994; Liman und Buck, 1994). Bei den in physiologischen Systemen vorkommenden CNG-Kanäle handelt es sich um heterotetramere Kanäle (Bradley *et al.*, 1994; Liman und Buck, 1994; Liu *et al.*, 1996; Kaupp und Seifert, 2002).

1.2.2 Physiologische Bedeutung

CNG-Kanäle sind in vielen verschiedenen Geweben im Körper zu finden. Die genauen Funktionen innerhalb der verschiedenen Gewebe sind bisher nicht für alle aufgeklärt. CNG-Kanäle tragen jedoch in allen Geweben zur Änderung des Membranpotentials bei. Aufgrund des Einwärtsstromes von Ca^{2+} -Ionen durch die geöffneten CNG-Kanäle, besitzen sie großen Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (Nakamura *et al.*, 1994; Frings *et al.*, 1995; Leinders-Zufall *et al.*, 1997, 2000; Dzeja *et al.*, 1999). Mit steigender intrazellulärer Liganden-Konzentration steigt die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle, wodurch die Konzentration an einströmenden Kationen erhöht wird.

Mutationen von CNG-Kanälen konnten bisher für verschiedene Krankheiten wie die Farbblindheit oder retinale Degeneration verantwortlich gemacht werden. So ist bekannt, dass Mutationen in den retinal vorkommenden CNG-Untereinheiten CNGA3 und CNGB3 zur sogenannten Achromatopsie führen (Trankner *et al.*, 2004). Der große Einfluss intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen spielt eine tragende Rolle in der olfaktorischen Adaptation (Kurahashi und Shibuya, 1990; Kramer und Siegelbaum, 1992; Borisy *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1994; Chen und Yau, 1994; Finn *et al.*, 1996; Kaupp und Seifert, 2002; Zheng *et al.*, 2003). Olfaktorische Sensorneurone, in denen die CNG-Kanäle eine bedeutende Rolle bei der Reizweiterleitung einnehmen, sind bipolare Neurone, die in das olfaktorische Epithel der Nasenhöhle eingebettet sind. Die einzelnen Dendriten dehnen sich in die apikale Oberfläche des Neuroepithels aus, während sich das Axon der jeweiligen Zelle zum olfaktorischen Riechkolben (Bulbus olfactorius) erstreckt (Kaupp und Seifert, 2002). Übertrifft das durch die CNG-Kanäle einströmende Ca^{2+} eine gegebene Schwelle, so bildet es mit dem ubiquitären Calmodulin einen Komplex, der sich an die CNG-Kanäle anlagern kann (Chen *et al.*, 1994; Chen und Yau, 1994; Liu *et al.*, 1994; Hsu und Molday, 1993, 1994; Gordon *et al.*, 1995; Song *et al.*, 2008). Da die CNG-Kanäle nicht durch die

dauerhafte Anwesenheit des aktivierenden Liganden desensibilisieren, werden sie durch die Anlagerung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes stark in ihrer Aktivität inhibiert (Chen *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1994; Zagotta und Siegelbaum, 1996). Durch die Bindung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes am N-Terminus wird eine Verbindung zwischen N- und C-Terminus der bindenden Untereinheit unterbrochen und somit die Konformationsänderung zur Öffnung des Kanals unterdrückt (Liu *et al.*, 1994; Molday, 1996; Varnum und Zagotta, 1997). Zusätzlich aktiviert der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex eine Phosphodiesterase, welche den aktivierenden Liganden der CNG-Kanäle in seine Bestandteile aufspaltet (Borisy *et al.*, 1992; Pifferi *et al.*, 2006).

Allerdings kann die olfaktorische Adaptation bei andauernder Anwesenheit eines Duftstoffmoleküls so nicht erklärt werden. Für die dauerhafte Adaptation im olfaktorischen System konnte noch keine Ursache, die in den CNG-Kanälen begründet ist, gefunden werden.

1.2.3 CNG-Kanäle des olfaktorischen Systems

CNG-Kanäle spielen eine wichtige Rolle im olfaktorischen Signaltransduktionsweg (Lancet, 1986; Reed, 1992; Zufall *et al.*, 1994; Kurahashi und Yau, 1994; Finn *et al.*, 1996). Der olfaktorische Rezeptor für Duftstoffe gehört den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an. Durch die Bindung eines Duftstoffmoleküls an diesen Rezeptor wird eine Adenylatzyklase aktiviert, wodurch es zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP) kommt (Nakamura und Gold, 1987). Dieser Anstieg bedingt das Öffnen der CNG-Kanäle, was einen Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen zur Folge hat. Es kommt zu einer Depolarisation des olfaktorischen Neurons. Das einströmende Ca^{2+} öffnet Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle, wodurch die Depolarisation weiter unterstützt wird (Kleene, 1993; Kurahashi und Kaneko, 1993; Kurahashi und Yau, 1993; Lowe und Gold, 1993; Zagotta und Siegelbaum, 1996; Kaupp und Seifert, 2002). In der Folge schüttet das Sensorneuron Neurotransmitter aus. Nachgeschaltete Neurone leiten die Information an das olfaktorische Riechsystem im Gehirn, den Riechkolben (Bulbus olfactorius), weiter. Die durch die Öffnung der CNG-Kanäle eingeströmten Ca^{2+} -Ionen werden durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aus dem olfaktorischen Sensorneuron heraus transportiert (Craven und Zagotta, 2006; Pifferi *et al.*, 2006) (Abb. 2).

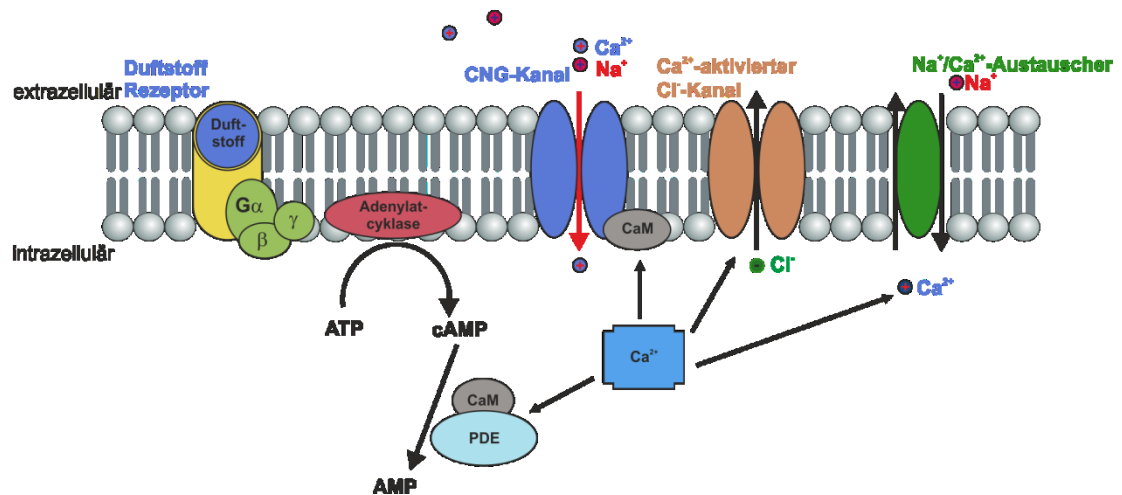


Abb.2: Signaltransduktionsweg im olfaktorischen Sensorneuron. Die Signalkaskade, die durch ein bindendes Duftstoffmolekül an einen Duftstoff-Rezeptor in Gang gesetzt wird, bewirkt einen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels. Dies führt zur Öffnung der CNG-Kanäle und damit zu einem Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen. Das eingeströmte Ca^{2+} aktiviert innerhalb der Zelle verschiedene Prozesse.

Der native olfaktorische CNG-Kanal ist ein Heterotetramer. Er setzt sich aus zwei CNGA2, einer CNGA4 und einer CNGB1b Untereinheit zusammen (Shapiro und Zagotta, 1998; Zheng und Zagotta, 2004; Bradley *et al.*, 2005) (Abb. 3).

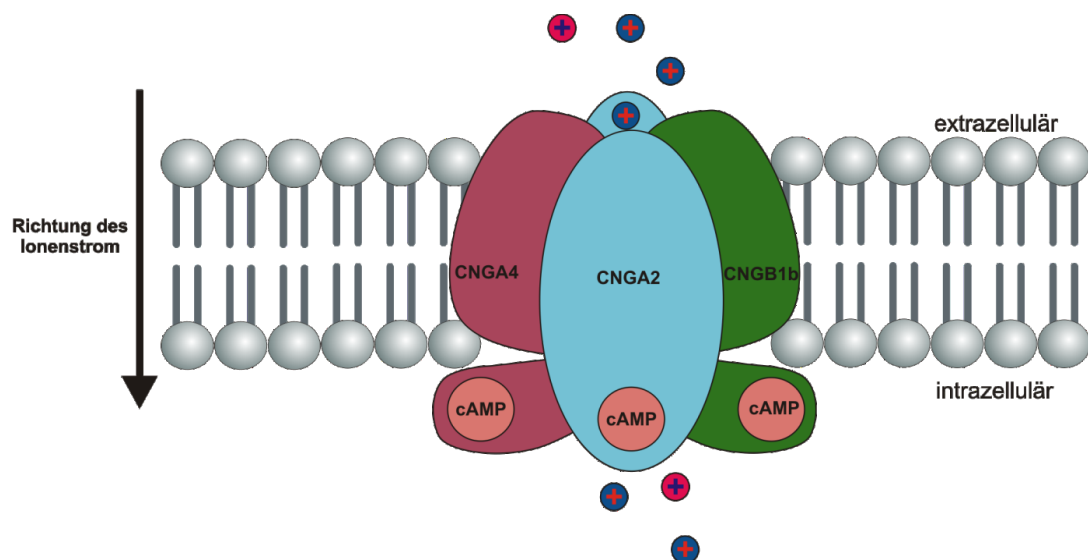


Abb. 3: Schema eines heterotetrameren CNG-Kanals des olfaktorischen Sensorneurons. Der physiologische Ligand cAMP bindet intrazellulär an die Bindestellen des Kanals und löst so einen einwärts gerichteten Ionenstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen aus.

Die Hauptuntereinheit im nativen olfaktorischen CNG-Kanal ist CNGA2 (Dhallan *et al.*, 1990; Ludwig *et al.*, 1990; Goulding *et al.*, 1992), die sowohl cAMP als auch cGMP binden kann (Kandasamy und Williams, 1983; Finn *et al.*, 1996; Zagotta und Siegelbaum, 1996). CNGA4 wird in der Regel zu den β -Untereinheiten gezählt, aufgrund der Sequenz ist sie aber den α -Untereinheiten ähnlicher. Sie besitzt die größte regulatorische Effektivität zur Bindung des Liganden (Bradley *et al.*, 1994; Liman und Buck, 1994; Kaupp und Seifert, 2002; Young und Krougliak, 2004). CNGB1b zählt zu den β -Untereinheiten und ist eine spezielle Spliceform von CNGB1 (Sautter *et al.*, 1998). Die β -Untereinheiten werden auch als modulatorische Untereinheiten bezeichnet, da sie keine funktionellen homotetramere Kanäle bilden können (Chen und Yau, 1994; Bradley *et al.*, 1994). Für die CNGB1-Untereinheit sind mehrere Splicevarianten bekannt. Allerdings sind CNGB1a aus den Stäbchen und CNGB1b aus dem olfaktorischen Sensorneuronen gesondert zu erwähnen. Die CNGB1b Untereinheit ist eine verkürzte Form der CNGB1a-Splicevariante (Sautter *et al.*, 1998). Ihr fehlt eine besonders Glutamat-reiche Sequenzfolge. Die CNGA2 Untereinheit unterliegt keinen proteolytischen Prozessen (Bönigk *et al.*, 1999), ihr N-Terminus liegt aber stark glykolysiert vor. Die Bedeutung dieser glykolysierenden Prozesse ist noch nicht bekannt, aber es wird ihnen eine tragende Rolle im Transport des Kanalproteins zur Membran und beim Einbau ins chemosensible Cilium zugeschrieben (Kaupp und Seifert, 2002).

1.2.4 Funktionelle Eigenschaften des olfaktorischen CNG-Kanals

Der heterotetramere olfaktorische CNG-Kanal ist für cGMP geringfügig sensibler als für cAMP. Beide Liganden weisen einen $K_{1/2}$ -Wert zwischen 1-20 μ M auf (Nakamura und Gold, 1987; Yau und Baylor, 1989; Frings *et al.*, 1992; Kurahashi und Kaneko, 1993; Finn *et al.*, 1996). Die hohe Effizienz von cGMP ist erstaunlich, da cAMP den physiologischen Liganden im olfaktorischen Signaltransduktionsweg darstellt. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass cGMP keine Relevanz im olfaktorischen System besitzt, da das Niveau für cGMP in diesen Zellen sehr gering ist und durch Duftstoffe nicht verändert wird. Der olfaktorische CNG-Kanal ist jedoch auch in anderen Geweben vertreten (Ahmad *et al.*, 1990; Biel *et al.*, 1993, 1994; Marunaka *et al.*, 1991; Weyand *et al.*, 1994; Zagotta und Siegelbaum, 1996; Richards und Gordon, 2000; Kaupp und Seifert, 2002). Dort könnte cGMP der physiologische Aktivator sein.

CNG-Kanäle besitzen als tetramere Proteine vier Liganden-Bindungsstellen (Kaupp *et al.*, 1989). Durch die direkte Bindung eines Liganden an eine Kanaluntereinheit wird dieser

geöffnet. Aber erst der zweite Bindungsschritt stabilisiert den Kanal im offenen Zustand und führt zu einer vollständigen Öffnung des Kanals. Die Bindung eines dritten und vierten Liganden stabilisiert den geöffneten Zustand zusätzlich (Li und Lester, 1999; Nache *et al.*, 2005; Biskup *et al.*, 2007). Allerdings sind CNG-Kanäle in der Lage in völliger Abwesenheit eines Liganden spontan zu öffnen (Picones und Korenbrot, 1995; Ruiz und Karpen, 1997, 1999; Tibbs *et al.*, 1997; Kleene, 2000; Kaupp und Seifert, 2002). Die Öffnungen sind aber nur von sehr kurzer Dauer und sehr instabil.

Da der CNG-Kanal ein nicht-selektiver Kationen-Kanal ist, der auch zweiwertige Kationen passieren lässt, können verschiedene Ionen unterschiedlichen Einfluss auf die Aktivität des Kanals nehmen (Haynes *et al.*, 1986; Zimmerman und Baylor, 1986; Yau und Baylor, 1989; Kolesnikov *et al.*, 1990; Frings *et al.*, 1992; Zufall und Firestein, 1993; Zufall *et al.*, 1994). So wie Ca^{2+} innerhalb der Pore an einer Bindestelle einige Zeit verweilt und damit den Na^{+} -Strom blockiert (Yau und Baylor, 1989; Kolesnikov *et al.*, 1990; Zufall *et al.*, 1994), kann ebenso Ni^{2+} die Aktivität der CNGA2-Untereinheit inhibieren (Ildefonse und Bennett, 1991; Karpen *et al.*, 1993; Gordon und Zagotta, 1995; Zong *et al.*, 1998; Kaupp und Seifert, 2002). Diese Inhibierung durch zweiwertige Kationen wird durch eine Reaktion mit Histidinresten des *C-Linker* der CNGA2-Untereinheit (H396) vermittelt, welche an der Konformationsänderung bei der Öffnung des Kanals beteiligt sind (Gordon und Zagotta, 1995b). Der N-Terminus geht eine Verbindung mit der Calmodulin-Bindestelle in der C-terminalen Region der CNGA2-Untereinheit ein, wodurch der Übergang zwischen Offen- und Geschlossenzustand erleichtert wird (Liu *et al.*, 1994; Gordon und Zagotta, 1995a, b; Varnum und Zagotta, 1997; Kaupp und Seifert, 2002). Durch die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an der dafür vorgesehenen Bindestelle der CNGA2-Untereinheit wird diese Verbindung unterbrochen, wodurch der Kanal in seiner Funktion beeinflusst wird.

Die Beta-Untereinheiten, CNGA4 und CNGB1b, besitzen ebenfalls Ca^{2+} /Calmodulin-Bindestellen, allerdings befinden sich diese an verschiedenen Stellen. Während die Bindestelle der CNGA2-Untereinheit im C-terminalen Bereich lokalisiert wurde, konnte die Bindestelle der CNGA4-Untereinheit im *C-Linker* (Kaupp und Seifert, 2002; Bradley *et al.*, 2004, 2005) und die Bindestelle der CNGB1-Untereinheit im N-Terminus identifiziert werden (Weitz *et al.*, 1998; Bradley *et al.*, 2005). Deshalb verläuft die Inhibierung des heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanal anders und nicht so effektiv wie im homotetrameren olfaktorischen CNG-Kanal.

Calmodulin ist ein ubiquitäres Ca^{2+} -Bindepotein, welches eine Vielzahl von Enzymen, Rezeptoren, Proteinen des Zytoskeletts sowie verschiedene Ionentransporter regulieren kann. Die Inhibierung der CNG-Kanäle durch Calmodulin ist abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Molday, 1996). Die Inhibierung der CNG-Kanäle bewirkt einen Ca^{2+} -

abhängigen negativen *Feedback*-Mechanismus der für das Phänomen der olfaktorischen Adaption verantwortlich zeichnet (Kramer und Siegelbaum, 1992; Kurahashi und Kaneko, 1993; Chen und Yau, 1994; Liu *et al.*, 1994; Kurahashi und Menini, 1997; Munger *et al.*, 2001; Zheng und Zagotta, 2004).

Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse können ebenso Einfluss auf die Aktivität des CNG-Kanals nehmen (Gordon *et al.*, 1995a). So wird die Sensibilität der CNGA2-Untereinheit auf cGMP um das 10-fache erhöht, wenn ein Serinrest in der CaM-Bindestelle (S93) durch eine Proteinkinase C phosphoryliert wird (Kaupp und Seifert, 2002).

2. Ziele der Arbeit

Der native olfaktorische CNG-Kanal setzt sich als Tetramer aus zwei CNGA2-, einer CNGA4- und einer CNGB1b-Untereinheit zusammen (Shapiro und Zagotta, 1998; Zheng und Zagotta, 2004). Um die funktionellen Unterschiede der einzelnen Untereinheiten genauer aufklären zu können, werden diese als homotetramere Kanäle in heterologen Systemen exprimiert und elektrophysiologisch untersucht.

Aufgrund der Vielzahl in der Literatur enthaltenen Informationen über den olfaktorischen homotetrameren CNG-Kanal war das Ziel dieser Arbeit, ein gültiges Modell mit kinetischen Geschwindigkeitskonstanten für den Kanal, beruhend auf Einzelkanaldaten, zu erstellen. In der Arbeitsgruppe wurde bereits 2007 ein Modell für den olfaktorischen homotetrameren CNG-Kanal, basierend auf makroskopischen Daten, publiziert (Biskup *et al.*, 2007). Ziel war es, dieses Modell, mit Hilfe von Einzelkanaldaten zu prüfen und zu modifizieren.

Der olfaktorische heterotetramere CNG-Kanal wurde bisher in der Literatur nicht so häufig beschrieben. Insbesondere sind nur sehr wenige Informationen des Einzelkanals zu finden (Bönigk *et al.*, 1999). Mittels Einzelkanaldaten erhofft man sich das funktionelle Verhaltensmuster des olfaktorischen heterotetrameren CNG-Kanals besser verstehen zu können und darauf aufbauend ein gültiges Modell für die Aktivierung des Kanals zu erstellen, um so das Verhaltensmuster des nativen olfaktorischen CNG-Kanals beschreiben zu können.

Verschiedene Zusammensetzungen der Untereinheiten des Tetramers bedingen eine Vielzahl unterschiedlicher Eigenschaften, die möglicherweise durch Einzelkanaldaten besser aufgeklärt werden können. Der Frage, inwieweit die β -Untereinheiten das Kanalverhalten verändern und welchen Einfluss die geringere Anzahl an α -Untereinheiten im Gefüge des Heterotetramers haben, sollte in dieser Arbeit nachgegangen werden.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur und molekularbiologische Methoden

In dieser Arbeit wurden homo- und heterotetramere olfaktorische CNG-Kanäle untersucht. Für den homotetrameren CNGA2-Kanal wurde die cRNA des Rinderkanals (Accession Nr. X55010) und für den heterotetrameren CNG-Kanal ein cRNA-Mix aus CNGA2:CNGA4:CNGB1b-Untereinheiten der Ratte (Accession Nr. AF126808, U12623 und AF068572) in einer Stöchiometrie von 2:1:1 verwendet. Die cRNA wurde von PD Dr. Thomas Zimmer bereit gestellt. Die zu exprimierende cRNA wurde bei -80 °C in 2 µl Aliquots aufbewahrt. Für die Messung makroskopischer Ströme wurde die cRNA unverdünnt oder in einer 1:1-Verdünnung injiziert. Für die Messung von Einzelkanalströmen wurden cRNA-Verdünnungen von 1:3 bzw. 1:5 verwendet.

3.1.1 Oozytenpräparation

Als Modellsystem wurden Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) verwendet. Der weibliche Krallenfrosch wurde mittels Tricaine betäubt. Dem narkotisierten Frosch wurden die Ovarien entnommen. Die Präparation erfolgte unter Anwendung des Protokolls von Goldin (1992). Die gewonnenen Oozyten wurden zur weiteren Isolierung aus dem Verband für 1 h 30 min in einer Ca^{2+} -freien Barth-Lösung mit Kollagenase (1,2 mg/ml Kollagenase Typ 1, Sigma) geschüttelt. Anschließend wurden sie mit Ca^{2+} -haltigem Barth-Medium gespült und zur endgültigen Isolierung unter einem Stereomikroskop mit Hilfe von Pinzetten von der Follikelmembran befreit. Für den folgenden Arbeitsverlauf wurden nur Oozyten des Entwicklungsstadiums V (Dumont, 1972) verwendet.

Einige Stunden nach der Isolierung der Oozyten erfolgte die Injektion der cRNA mittels dünn ausgezogener Glaspipetten aus Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser 2,0 mm, Innendurchmesser 1,6 mm; Hilgenberg, Malsfeld). Die injizierten Oozyten wurden anschließend in Ca^{2+} -haltiges Barth-Medium überführt und im Brutschrank bei +18 °C 1-3 Tage aufbewahrt.

Kurz vor Anwendung der *Patch-Clamp*-Technik wurde zur Freilegung der eigentlichen Zellmembran unter stereomikroskopischer Kontrolle mit Hilfe von Pinzetten die noch

vorhandene Vitellinmembran entfernt. Diese mechanische Entfernung erfolgte in der verwendeten Kontroll-Badlösung (KCl-Lösung, siehe 3.4) um ein Übertreten störender Ionen in die Messkammer zu vermeiden.

3.2 Elektrophysiologie

3.2.1 Pipettenherstellung

Für die Messung von makroskopischen Strömen und Einzelkanalströmen wurden *Patch*-Pipetten aus Quarzglaskapillaren (Außendurchmesser 1,0 mm und Innendurchmesser 0,75 mm bzw. Außendurchmesser 1,0 mm und Innendurchmesser 0,5 mm) verwendet. Die Kapillaren wurden mit einem Laser-Puller (SutterInstrument 2000) in zwei Zügen auf den jeweils gewünschten Durchmesser gezogen. Der Widerstand der Pipetten für makroskopische Ströme betrug 1,0-1,5 M Ω während der Widerstand für Einzelkanalmessungen zwischen 6-8 M Ω lag.

3.2.2 *Patch-Clamp*-Technik

Die *Patch-Clamp*-Technik zur Messung von Ionenkanälen in Membranen lebender Zellen wurde bereits 1976 von Neher und Sakmann entwickelt. Insgesamt verwendet man vier verschiedene *Patch*-Konfigurationen, mit denen man makroskopische Ströme über die gesamte Zellmembran oder Ströme einzelner Kanalproteine messen kann. Der Vorteil der *Patch-Clamp*-Technik im Gegensatz zu anderen *Voltage-Clamp*-Verfahren ist die extrem hohe Auflösung gemessener Signale bis in den fA-Bereich hinein. Derart kleine Ströme, konnten bis dahin noch nicht vom Hintergrundrauschen unterschieden werden. Entscheidend für die Reduktion des Hintergrundrauschens ist der hohe Abdichtwiderstand zwischen Pipettenöffnung und Zellmembran (engl. *seal* = Abdichtung, Versiegelung). In der Pipette wird ein Unterdruck erzeugt, wodurch die Membran in die Öffnung gesaugt wird. Dadurch kommt es zu einer sehr dichten Verbindung von ca. 1 nm (Corey und Stevens, 1983) zwischen Pipettenspitze und Zellmembran. Für diese Verbindung sind vorwiegend Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Ca⁺²-Brücken und Van-der-Waals-Kräfte verantwortlich (Opsahl und Webb, 1994). Der elektrische Widerstand zwischen Pipetteninnerem und umgebender Badlösung beträgt im Idealfall mehrere zehn Gigaohm, weshalb vom sogenannten *Gigaseal* gesprochen wird.

3.2.3 Messaufbau

Um zu verhindern, dass Einflüsse von außen die Messungen stören, wird der gesamte Versuchsaufbau auf einen schwingungsfreien Tisch gelagert und durch einen Faraday-Käfig isoliert. Sämtliche Messungen werden in einer Plexiglaskammer durchgeführt, die mit Hilfe eines Zu- und Ablaufsystems einen ständigen Lösungswechsel zwischen verschiedenen Badlösungen ermöglicht. Ein Pipettenhalter, der im direkten Kontakt zu einem Vorverstärker (der sogenannten Headstage) steht, fixiert die Messpipette in ihrer Position. Der Kontakt mit dem Verstärker wird mit einer Elektrode (chlorierter Silberdraht) hergestellt. Mittels eines Mikromanipulators kann der Pipettenhalter unter optischer Kontrolle dreidimensional positioniert werden. Mit Hilfe einer mit dem Pipettenhalter verbundenen Spritze kann auf die Lösung im Inneren der Pipette ein Über- bzw. Unterdruck ausgeübt werden. Als Badelektrode dient ein geerdetes Ag/AgCl-Pellet (Abb. 5).

Vor dem Eintauchen der Pipette in die Messlösung wird ein leichter Überdruck angelegt. Dadurch werden leichte Verunreinigungen, wie Staubpartikel die sich an der Pipettenspitze abgesetzt hatten, entfernt. Das Aufsetzen an der Membran wird optisch über den Monitor, der mit einer Videokamera verbunden ist bzw. durch die Beobachtung des Pipettenwiderstandes verfolgt. Durch Wegnahme des Überdruckes und der Applikation eines leichten Unterdrucks entsteht der *Gigaseal*. Anschließend wird der von der Pipette eingeschlossene Membranfleck durch schnelles Exzidieren von der Zellmembran isoliert und ein Patch in der *inside-out*-Konfiguration entsteht.

Die *Inside-out*-Konfiguration ermöglicht die Aktivierung von CNG-Kanälen, da diese über intrazelluläres cGMP bzw. cAMP aktiviert werden. Bei dieser Konfiguration befindet sich die intrazelluläre Seite der Membran in Kontakt mit der Badlösung, während die extrazelluläre Seite mit der Pipettenlösung in Verbindung steht.

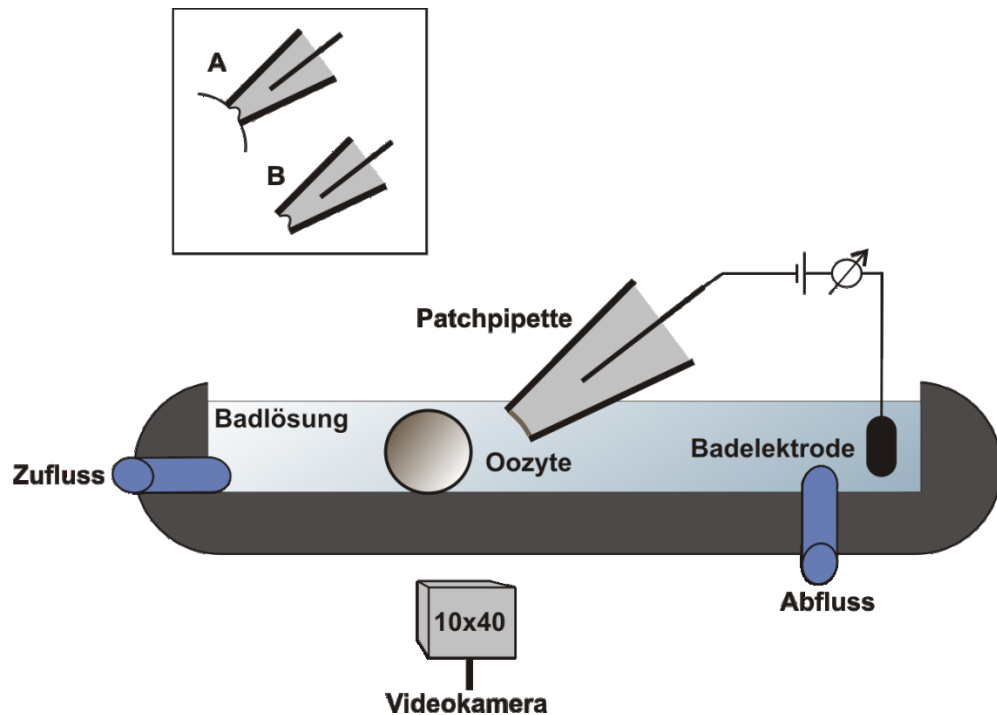


Abb.5: Messaufbau. Die von der Vitellinmembran befreite Oozyte befindet sich in einer ligandenfreien Badlösung. Die Pipette wird auf die Membran der Zelle aufgesetzt. Durch das Anlegen eines leichten Unterdruckes an der Pipette entsteht ein *Seal*. Die Pipette wird durch eine schnelle Bewegung von der Zelloberfläche entfernt, wodurch ein kleiner Membranfleck isoliert wird. Der anschließend an der Pipette befindliche Membranfleck liegt in der *inside-out*-Konfiguration vor. So können verschiedene Konzentrationen von Liganden an die Innenseite der Membran angewaschen werden. **A)** zeigt eine *inside-out*-Konfiguration vor dem Exzidieren, **B)** nach dem Exzidieren.

In allen Messungen wird zunächst eine sättigende Konzentration cGMP ein- und wieder ausgespült, um die maximale Stromamplitude zu ermitteln bzw. die in einem *Patch* befindliche Kanalzahl zu bestimmen. Anschließend werden die entsprechenden Pulsprotokolle gestartet und die verschiedenen Lösungen ein- und wieder ausgewaschen.

Als Verstärker wird ein Axopatch 200A (Axon Instruments, Inc, Foster City, USA) verwendet. Die Registrierung erfolgt bei einer Filterfrequenz von 5 kHz mittels eines 4-Pol Bessel-Filters.

3.3 Datenerfassung

Die Datenerfassung und -auswertung wird mit Hilfe des Programmpaketes ISO2 (MFK, Niederhausen) sowie Excel 2007, Origin 8.1 (Northampton, USA) und Igor Pro 6 (Lake Oswego, USA) erstellt. Aufgrund der Systemanforderungen der ISO2 Software zur Aufzeichnung der Messungen wird eine 12-bit A/D-Karte für die Übermittlung der Pulsprotokolle vom PC an den Verstärker verwendet, die Ströme werden im Verstärker zu einer proportionalen Spannung gewandelt und mit einer 12-bit A/D-Karte digitalisiert. Die Aufnahmerate beträgt 20 kHz. Die Messdaten für die Einzelkanalströme werden anschließend zur weiteren Auswertung mit einem Gauß-Algorithmus auf 1 kHz gefiltert.

Die Aufzeichnung der makroskopischen Ströme erfolgt diskontinuierlich nach Spannungssprüngen innerhalb eines Pulsprotokolls (Abb. 6), während die Einzelkanalströme kontinuierlich bei +100 mV registriert werden.

3.4 Lösungen

Die cGMP-haltige Badlösung wird unter Verwendung von zyklischem Guanosin-3',5'-Monophosphat (als Natriumsalz von Sigma) hergestellt. Die 50 mM Stammlösungen sowie alle weiteren Verdünnungen werden unter Verwendung der zyklisch Nukleotid-freien Badlösung (Kontroll-Lösung, KCl-Lösung), die in Tabelle 1 aufgelistet ist, hergestellt.

Die mit cRNA-injizierten Oozyten werden vereinzelt in Barth-Medium (Tab. 2) gelagert.

Tab. 1: KCl-Lösung

KCl-Lösung	mM	1000 ml
KCl	150	11,184 g
EGTA	1	0,380 g
Hepes	5	1,192 g

pH 7,4 mit KOH

Tab. 2: Barth-Medium

Barth-Medium mit Ca^{2+} und Antibiotika (für Oozyten)	mM	1000 ml
NaCl	84	4,900 g
KCl (1 M)	1	1 ml
NaHCO_3	2,4	0,202 g
MgSO_4	0,82	0,202 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,33	0,078 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,41	0,060 g
TRIS	7,5	0,910 g
Cefuroxim		10 ml
Penicillin/Streptomycin		10 ml

pH 7,4 mit HCl

3.5 Datenanalyse

3.5.1 Makroskopische Ströme

3.5.1.1 Erstellung einer Konzentration-Wirkungs-Beziehung

Für die Erstellung einer Konzentration-Wirkungs-Beziehung zwischen Liganden-Konzentration und Kanalantwort wird für den homo- sowie für den heterotetrameren CNG-Kanal folgendes Pulsprotokoll verwendet (Abb. 6).

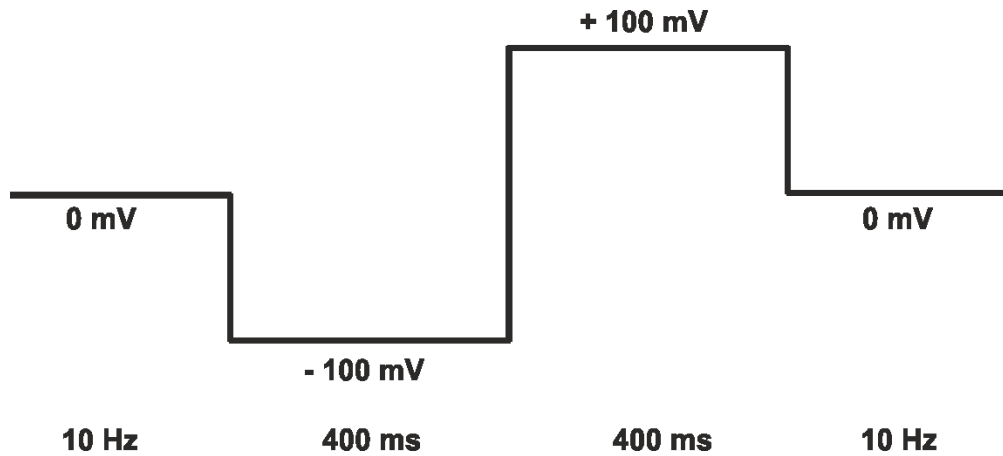


Abb. 6: Pulsprotokoll das für makroskopische Ströme angewendet wird. Spannungssprung von -100 mV auf +100 mV.

Um alle Kanäle eines *Patch* maximal zu aktivieren, wird zunächst die sättigende cGMP-Konzentration von 100 μM cGMP appliziert. Anschließend werden verschiedene ungesättigte cGMP-Konzentrationen eingewaschen und die verminderten Stromantworten aufgezeichnet. Zwischen jeder Konzentration wird die cGMP-freie Badlösung appliziert um eine Verfälschung durch vorherig genutzte cGMP-Konzentrationen in der Stromantwort zu vermeiden und um bei der Analyse durch die Dauer der Messungen entstandene Leckströme von den eigentlichen Stromantworten abzuziehen.

Nachdem die Leck- und kapazitiven Ströme von der eigentlichen Stromantwort abgezogen wurden, wird aus möglichst vielen Stromspuren ein Mittelstrom ermittelt und dieser für weitere Analysen separat abgespeichert.

Aus den Gleichgewichtsströmen wird anschließend das Verhältnis aus aktueller und maximaler Stromantwort I/I_{max} ermittelt.

Die Konzentration-Wirkungs-Beziehung wird quantifiziert, indem die normierten Ströme in die Gleichung 1 eingesetzt werden. Dabei können die Werte für den Hill-Koeffizienten (H) und den EC_{50} -Wert (halbmaximale cGMP-Konzentration) bestimmt werden. Die Fehlerangabe der Mittelwerte erfolgte als SEM.

$$I/I_{\text{max}} = 1 / \{1 + (EC_{50}/[\text{cGMP}])^H\} \quad \text{(Gleichung 1)}$$

3.5.2 Einzelkanalströme

Die Einzelkanalströme werden kontinuierlich bei + 100 mV und mit einer Filterfrequenz von 5 kHz aufgezeichnet. Zur weiteren Analyse, wie die Bestimmung der Offen- und Geschlossenzeiten, der Offenwahrscheinlichkeit und der Stromamplitude, werden die Messungen *off-line* mit einem Gauß-Algorithmus mit einer Filterfrequenz von 1 kHz gefiltert. Alle *Patche* enthalten nur einen einzigen Kanal, was aus der nicht vorhandenen Überlappung zweier Einzelkanalereignisse bei sättigender cGMP-Konzentration geschlussfolgert wird.

3.5.2.2 Erstellen von Amplituden-Histogrammen

Zur Erstellung der Amplituden-Histogramme wird ein Algorithmus der ISO-Software verwendet. Dieser tastete die Messungen ab und registriert die Anzahl der Datenpunkte, die dann einer Amplitudenklasse zugeordnet werden. Die *off-line*-korrigierten Daten werden anschließend in einem Histogramm aufgetragen. Die Darstellung der Verteilung der Amplitudenereignisse erfolgt hierbei in Klassen (Bins). Die Amplituden des geschlossenen und geöffneten Kanals, werden durch mathematische Approximation mit einer Gauß-Verteilung ermittelt. Der Mittelwert der beiden ermittelten Gauß-Kurven wird als Schwellenwert für die Offen-Geschlossen-Zeit-Analyse verwendet.

3.5.2.1 Erstellen einer Konzentration-Wirkungs-Beziehung

Zur Erstellung einer Konzentration-Wirkungs-Beziehung zwischen Liganden-Konzentration und Kanalantwort trägt man das Verhältnis zwischen Liganden-Konzentration und Offenwahrscheinlichkeit auf. Die Einzelkanaldaten werden mit einer Schwelle von 50 % der Amplitude analysiert (Abb. 7), um „ideale“ Daten zu erhalten. Jeder Datenpunkt, der sich unter der Schwelle befindet, wird dem geschlossenen und jeder Datenpunkt, der sich über der Schwelle befindet, dem geöffneten Kanal zugeordnet. Für die Auswertung des heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanals wurde diese Analyse erweitert, indem die

halbmaximale Schwelle aufgespalten wurde (Abb. 8) um eine genauere Unterscheidung zwischen den Ereignissen des offenen und des geschlossenen Zustandes zu treffen.

Die Offenwahrscheinlichkeit (P_{open}) wurde ermittelt, indem die Anzahl der Datenpunkte des geöffneten Zustandes auf die Gesamtzahl der Datenpunkte normiert wurde.

Die Konzentration-Wirkungs-Kurve wurde durch Einsetzen der Werte in Gleichung 1 erstellt (anstelle des Verhältnisses aktueller und maximaler Stromantwort I/I_{max} wurde die Offenwahrscheinlichkeit P_{open} eingesetzt) und die Werte für Hill-Koeffizient und EC_{50} konnten darüber bestimmt werden. Die Fehler wurden als SEM dargestellt.

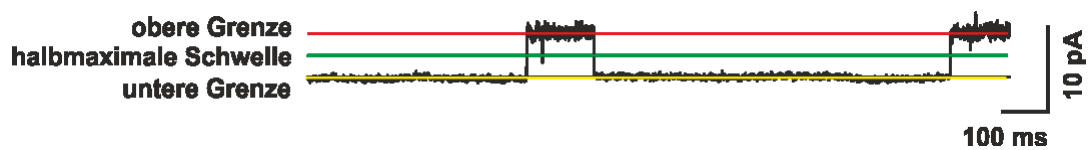


Abb. 7: Darstellung der Analyse des Einzelkanalstromes durch die Verwendung einer halbmaximalen Schwelle.

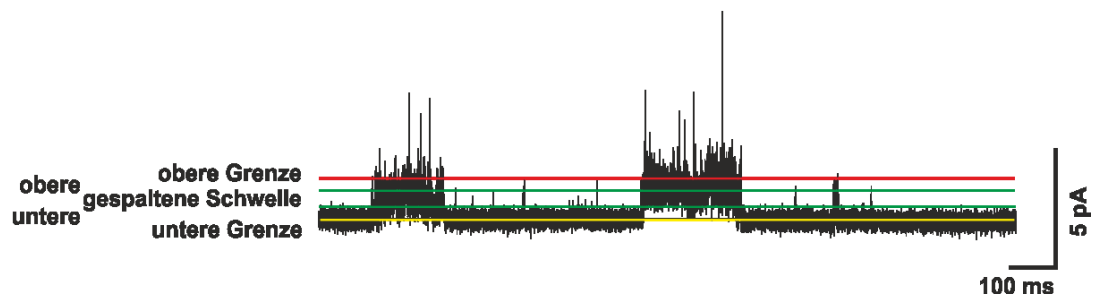


Abb. 8: Darstellung des Analyseansatzes zur Erstellung von idealen Daten mit Hilfe der Setzung einer gespaltenen Schwelle.

3.5.2.3 Offen- und Geschlossenzeit-Histogramme

Aus den idealisierten Daten wird die Dauer der Offen- und Geschlossenzeiten ermittelt (ISO2). Es werden Histogramme für die Häufigkeiten der verschiedenen Ereignislängen erstellt. Zu beachten ist, dass logarithmische Bins verwendet und auf die y-Ordinate die Wurzel der Ereignisanzahl aufgetragen wird, um die einzelnen exponentiellen Prozesse

besser identifizieren zu können. Die Erstellung der Histogramme erfolgt nach einer Methode von Sigworth (Sigworth und Sine, 1987). Man kann die Histogramme auch mit linearen Zeitachsen auftragen und anschließend mit einem (multi-)exponentiellen Abfall berechnen, um die entsprechenden Zeitkonstanten und Amplituden ermitteln zu können (Gleichung 2, A = Integral der Amplitude, τ = Zeitkonstante).

$$y = A_1 e^{-(x/\tau_1)} + A_2 e^{-(x/\tau_2)} \dots \quad \text{(Gleichung 2)}$$

Für die verwendeten logarithmischen Bins muss die Gleichung entsprechend angepasst werden (Gleichung 3). Vorteil dieser Auftragung ist, dass sich ein Maximum für jede Zeitkonstante ergibt. Zusätzlich wird die Wurzel der Ereigniszahl aufgetragen, da in dieser Darstellung die Streuung für alle Amplituden gleich ist (Sigworth und Sine, 1987) (Gleichung 3, A = Integral der Amplitude, τ = Zeitkonstante).

$$y = (A_1 e^{(x-\tau_1)} \ln(10) e^{(x-\tau_1)} \ln(10) + A_2 e^{(x-\tau_2)} \ln(10) e^{(x-\tau_2)} \ln(10) + \dots)^{1/2} \quad \text{(Gleichung 3)}$$

3.5.2.4 Modellierung der Einzelkanaldaten

Zur Ermittlung eines Modells, das die Einzelkanaldaten beschreibt, wird die frei erhältliche QuB-Software (www.buffalo.edu) verwendet (Milescu *et al.*, 2008). In dieser Software können die Originaldaten eingelesen, nachbearbeitet (*off-line* Filterung und *Baseline*-Korrektur) und idealisiert werden. Desweiteren ermöglicht die Software (*Hidden*-) Markov-Modelle zu erstellen und die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten global zu optimieren, wodurch verschiedene Modelle quantitativ verglichen werden können. Hierfür verwendet die Software eine *Maximum-Likelihood*-Optimier-Routine (Qin *et al.*, 1996; Qin *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2004).

3.5.2.5 Analyse der Rauschereignisse

Die in einzelnen Fällen aufgetretenen Rauschamplituden des homotetrameren CNG-Kanals können mittels Amplituden-Histogrammen analysiert werden. Um zusätzlich die Frequenzabhängigkeit des offenen Kanalrauschens zu ermitteln, transformiert man die Daten mittels FFT (*Fast Fourier Transformation*) in den Frequenzraum (Sigworth, 1985, 1986) und subtrahiert davon das entsprechende Spektrum des geschlossenen Kanals. Die Amplituden und deren Verteilungen werden als Intensität der Ereignisse gegen die Frequenz aufgetragen. Die Intensitäten normiert man auf 1, um die Unterschiede in der Frequenzabhängigkeit des Rauschens getrennt von der gesamten Rauschamplitude betrachten zu können. Von einer Berechnung mit einer Lorentz-Funktion unter Bestimmung einer Eckfrequenz sieht man ab, da diese sehr nahe an der verwendeten Filterfrequenz liegt ($\sim 3,0 - 3,5$ kHz bei 5 kHz-Filter).

Der heterotetramere CNG-Kanal zeigt ebenfalls besondere Rauschereignisse im offenen Kanal. Diese Ein-, Zwei- und Mehrpunkttereignisse mit Amplituden bis zu 11,0 pA werden getrennt vom eigentlichen Hauptamplitudenniveau (ca. 1,3 pA) des offenen Kanals analysiert. Um eine Korrelation zwischen dem Auftreten dieser Ereignisse mit steigenden Liganden-Konzentrationen nachweisen zu können, wird die Häufigkeit dieser Ereignisse im Verhältnis zu der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals betrachtet. Hierzu normiert man die Anzahl der Ein-, Zwei- und Mehrpunkttereignisse auf die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals und trägt sie anschließend gegen steigende cGMP-Konzentrationen auf.

3.5.2.6 Aktivität des Kanals über die Zeit und der Nachweis mikroskopischer Reversibilität

Die Darstellung der Einzelkanalmessung im Analyseprogramm der ISO-Software erfolgt in Abschnitten mit einer Dauer von 1,5 s. Änderungen der Kanalaktivität über den gesamten Zeitabschnitt einer Messung können dargestellt werden, indem man die mittlere Amplitude eines solchen 1,5 s Abschnittes (gemittelt werden sämtliche Amplitudenwerte eines Abschnittes) gegen die steigende Anzahl der Abschnitte darstellt. So kann nachgewiesen werden, dass der Kanal auch in ständiger Anwesenheit des aktivierenden Liganden nicht desensitisiert.

Um zu testen ob dem Kanalverhalten eine mikroskopische Reversibilität zugrunde liegt, wird der Einfluss einer Offenzeit auf die nachfolgende Geschlossenzeit und umgekehrt untersucht.

Die Offenzeiten werden gegen die dazugehörigen Geschlossenzeiten in ein 2D-Histogramm aufgetragen. Für ein voll reversibles System sollte die Analyse „vorwärts“ und „rückwärts“ (Steinberg, 1987) identisch sein, d.h. die Differenz der beiden Histogramme sollte keine deutlichen Strukturen aufweisen und somit nur aus Rauschen bestehen. Um dies nicht nur optisch darzustellen, wird zusätzlich ein Chi-Quadrat-Test (Gleichung 4) zum Nachweis eines signifikanten Unterschiedes angewandt (Song und Magleby, 1994).

$$\chi^2 = \sum_{i,j} \left\{ \frac{[F(i,j) - E(i,j)]^2}{E(i,j)} + \frac{[B(i,j) - E(i,j)]^2}{E(i,j)} \right\} \quad \text{(Gleichung 4)}$$

Für den Chi-Quadrat-Test werden lediglich die Bins analysiert, die für die Vorwärts- und Rückwärts-Richtung ein Wert von 5 oder mehr Ereignissen aufweisen.

In Gleichung 4 entsprechen $F(i,j)$ und $B(i,j)$ der Anzahl der Ereignisse in einem Bin (i,j) für die Vorwärts- (F) und die Rückwärts-Analyse (B). Hinter $E(i,j)$ verbirgt sich der Mittelwert der Ereignisse für beide Analysen (Gleichung 5).

$$E(i,j) = [F(i,j) + B(i,j)]/2 \quad \text{(Gleichung 5)}$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade entspricht der Anzahl der betrachteten Bins (D). Für hohe Freiheitsgrade wird oft (wie auch in diesem Fall) die Normalapproximation des Chi-Quadrat-Testes verwendet (Gleichung 6). Für ein Signifikanzniveau von 0,05 muss die Normalapproximation (Z) unter 1,96 sein, damit man von identischen Verteilungen ausgehen kann.

$$Z = \sqrt{2\chi^2} - \sqrt{(2D - 1)} \quad \text{(Gleichung 6)}$$

Bei einem signifikanten Unterschied wäre damit der Nachweis erbracht das keine mikroskopische Reversibilität im getesteten System vorliegt.

3.5.2.7 Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken bei Einzelkanalströmen

Der Einzelkanalstrom eines heterotetrameren CNG-Kanals zeigt häufig ein eigenartiges Verhalten bei der Öffnung und Schließung im Sinne einer Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik. Um dieses Kanalverhalten besser aufzulösen, werden je 100 Ereignisse gesammelt und separat ausgewertet. Die 100 Ereignisse mittelt man und schätzt anschließend mit Hilfe eines mono- oder biexponentiellen Verlaufs die Zeitkonstanten dieser Kinetiken ab (Gleichung 2).

4. Ergebnisse

4.1 Der homotetramere CNG-Kanal (CNGA2)

Der homotetramere CNG-Kanal setzt sich aus vier CNG-Untereinheiten des Types A2 zusammen. Für die hier untersuchten Einzelkanalmessungen wurde die aus dem Genom des Rindes (*Bos taurus*) klonierte CNGA2-Untereinheit in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Um sicher zu stellen, dass sich in den untersuchten *Patches* nur ein einzelner Kanal befand, wurde zu Beginn jeder Messung eine sättigende Konzentration cGMP eingewaschen. Die Aktivierung des Kanals wurde bei vier nicht-sättigenden cGMP-Konzentrationen (0,25 μ M, 0,75 μ M, 1 μ M, 2 μ M) sowie einer Kontroll-Lösung (ohne Ligand) und der sättigenden Konzentration (100 μ M) untersucht.

Die *Patche* wurden bei einer Spannung von +100 mV vermessen. Dies bewirkte große Einzelkanalströme und damit ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis. Abbildung 9 zeigt Beispielmessungen für alle getesteten Liganden-Konzentrationen.

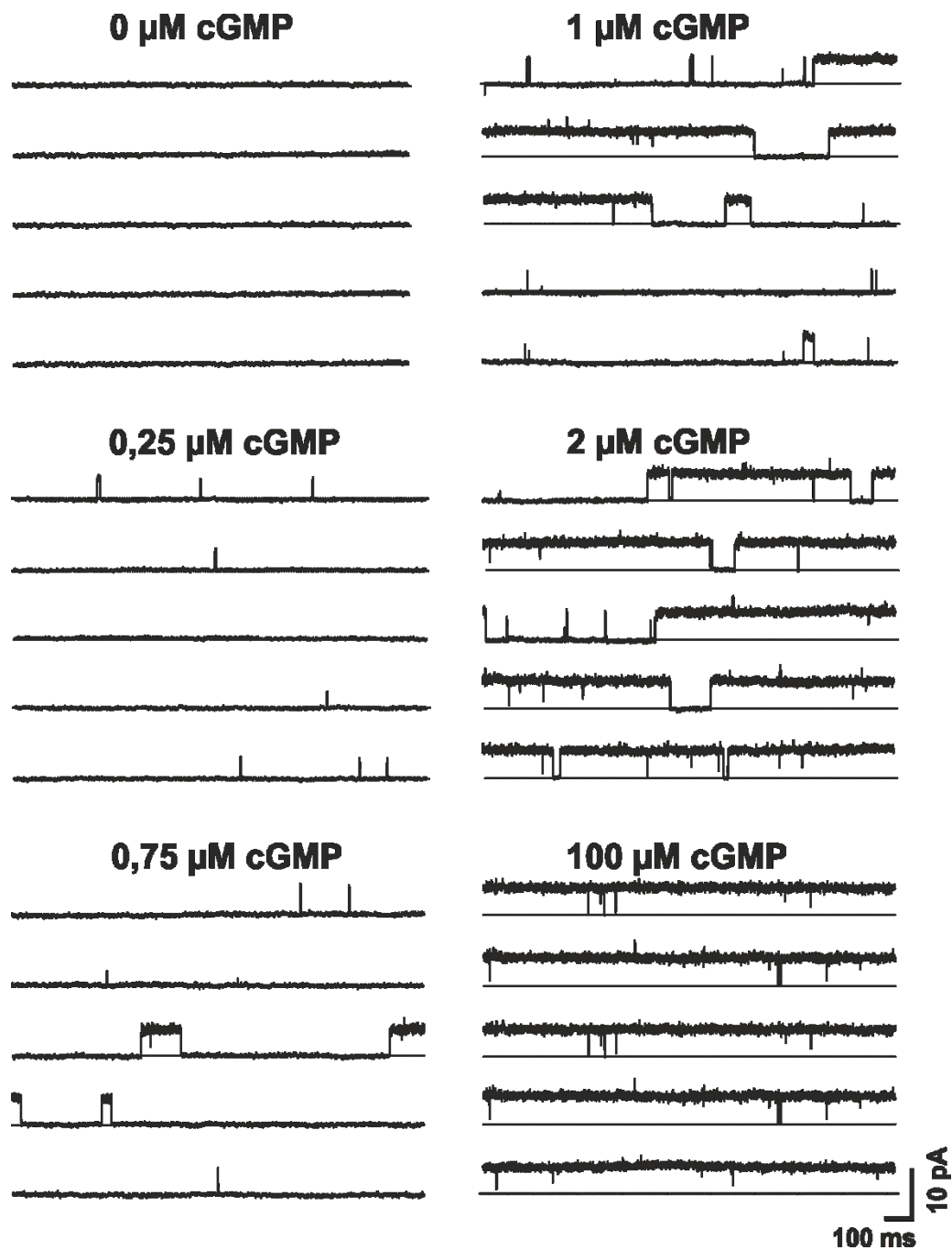


Abb. 9: Registrierung von Einzelkanalströmen des homotetrameren CNG-Kanals (CNGA2). Die Registrierung erfolgte bei unterschiedlichen cGMP-Konzentrationen (0, 0,25, 0,75, 1, 2 und 100 μM cGMP). Die Kontroll-Lösung, ohne Ligand, zeigte kaum spontane Öffnungen, die Offenwahrscheinlichkeit betrug 0,0004 % (Ereignisse nicht gezeigt). Mit steigender cGMP-Konzentration nahm die Offenwahrscheinlichkeit zu. Bei einer sättigenden Liganden-Konzentration (100 μM cGMP) waren sehr kurze schnelle Schließungen zu sehen, die Offenwahrscheinlichkeit betrug 99,8 %. Die Amplitude des Einzelkanalstromes blieb auch bei steigenden Liganden-Konzentrationen konstant (4 – 6 pA).

4.1.1 Einzelkanalstrom

Um den Einzelkanalstrom bei den verschiedenen cGMP-Konzentrationen zu charakterisieren, wurden Amplituden-Histogramme erstellt. In diese Amplituden-Histogramme wurden alle Messungen einbezogen (Abb. 10). Es konnte keine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Amplitude verzeichnet werden. Die Amplitude schwankte in den gezeigten Konzentrationen jeweils um einen Wert von $5,5 \pm 0,29$ pA. Die Leitfähigkeit des Kanals beträgt ca. $50 \pm 1,7$ pS, wenn man Linearität annimmt.

Mit steigender Liganden-Konzentration nimmt die Offenwahrscheinlichkeit zu. Dies erkennt man an dem größeren Anteil der Verteilung für die offene Population (Abb. 10).

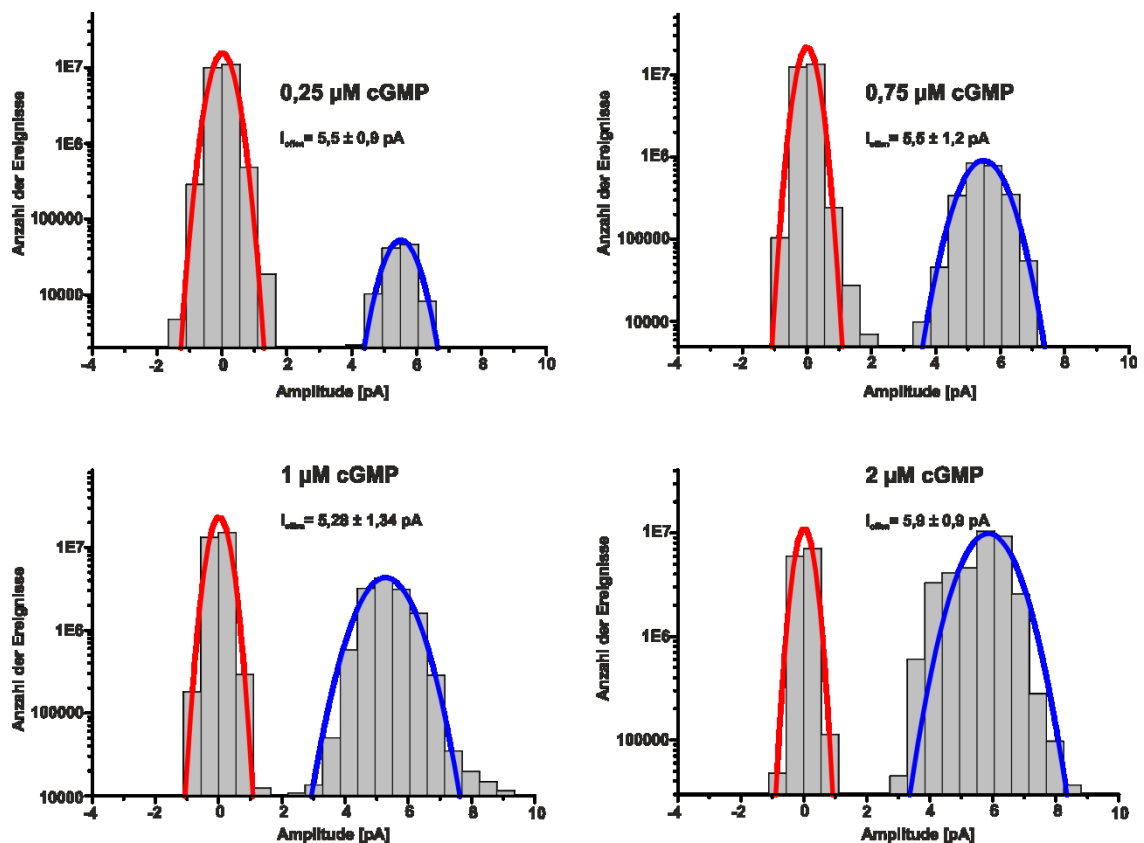


Abb. 10: Amplituden-Histogramme für den homotetrameren CNG-Kanal (CNGA2) für steigende Liganden-Konzentrationen. Die angepasste Kurve in rot zeigt die Gauß-Verteilung für die Ereignisse in der Grundlinie (für die geschlossenen Ereignisse) und die approximierte Kurve in blau die Gauß-Verteilung für die offenen Ereignisse. Die Anzahl der Ereignisse ist logarithmisch dargestellt. Bei hohen Konzentrationen sind minimale Subpopulationen in den offenen Ereignissen zu finden, diese sind in einigen Fällen „High-Noise“-Amplituden des Kanals. Im Detail werden diese Ereignisse später besprochen. Je Konzentration wurden 6 – 9 *Patche* für die Analyse verwendet.

In Tabelle 3 sind die Werte der Offenwahrscheinlichkeiten (P_{open}) und die Stromamplituden für die unterschiedlichen Liganden-Konzentrationen gezeigt.

Tab. 3: Werte für die Offenwahrscheinlichkeiten und maximalen Stromantworten bei unterschiedlichen Liganden-Konzentrationen.

cGMP [μM]	P_{open}	I_{open} [pA]
0	0,0004	$0,0 \pm 0,6$
0,25	0,004	$5,5 \pm 0,9$
0,75	0,07	$5,5 \pm 1,2$
1	0,3	$5,28 \pm 1,34$
2	0,8	$5,86 \pm 1,46$
100	0,99	$5,7 \pm 0,9$

Die bereits in der Literatur beschriebenen Einzelkanäle zeigen Ströme von 2,0 – 2,5 pA (Bönigk *et al.*, 1999; Li und Lester, 1999), allerdings muss in diesen Fällen berücksichtigt werden, dass die Messungen bei +50 mV (cAMP) (Bönigk *et al.*, 1999) bzw. bei -60 mV (cGMP) (Li und Lester, 1999) registriert wurden. In allen Studien betrug die Leitfähigkeit des Kanals etwa 50 pS. Dies zeigt, dass die Leitfähigkeit über einen weiten Spannungsbereich, für verschiedene Spezies und bei Aktivierung durch verschiedene Liganden vergleichbar groß ist.

4.1.2 Konzentration-Wirkungs-Beziehung

Makroskopisch wird eine größere Stromantwort von CNG-Kanälen bei steigenden Liganden-Konzentrationen beobachtet.

Theoretisch gibt es zwei mögliche Erklärungen für eine verstärkte Kanalantwort mit zunehmenden Liganden-Konzentrationen: (1) eine mit steigender Liganden-Konzentration größer werdende Leitfähigkeit, aufgrund einer vergrößerten Pore wodurch vermehrt Ionen gleichzeitig den Kanal passieren können oder (2) eine steigende Offenwahrscheinlichkeit, aufgrund größerer Liganden-Konzentration. In 4.1.1 wurde gezeigt, dass für das CNGA2-Homotetramer die 2. Möglichkeit zutrifft, d.h. die Offenwahrscheinlichkeit nimmt mit steigenden Liganden-Konzentrationen zu und jeder Kanal besitzt eine Pore mit gleicher Leitfähigkeit. Daher kann die Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit von der Liganden-Konzentration bei Einzelkanalmessungen mit dem normierten Strom makroskopischer Messungen verglichen werden.

Für den Vergleich der Einzelkanalmessungen mit makroskopischen Strömen wurden mittels der *Patch-Clamp*-Technik exzidierte *Patche*, in denen sich 100 – 1000 Kanäle befinden, in der *inside-out*-Konfiguration vermessen. Abbildung 11 zeigt die Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit der Einzelkanäle und des Stromes aus Makropatchen von der Liganden-Konzentration. Theoretisch sollten beide in gleicher Weise von der Liganden-Konzentration abhängig sein. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Konzentration-Wirkungs-Kurve für Einzelkanalströme steiler ansteigt.

Zur Quantifizierung wurden die Werte für die halbmaximale Aktivierung (EC_{50}) und den Hill-Koeffizienten mit Hilfe der Gleichung 1 (siehe Material und Methoden 3.5.1.1) bestimmt. Die EC_{50} -Werte unterscheiden sich nur unwesentlich. Für makroskopische Ströme beträgt die Konzentration für die halbmaximale Aktivierung $1,69 \mu\text{M}$ und für Einzelkanalströme $1,72 \mu\text{M}$, es liegt kein signifikanter Unterschied vor. Der Wert für den Hill-Koeffizienten (H) dagegen vergrößert sich von 2,3 bei makroskopischen Strömen auf 3,1 in Einzelkanalmessungen. Dennoch unterscheiden sich die Werte bei der Testung mittels T-Test nicht signifikant, die Werte liegen deutlich über einem Signifikanzniveau von 0,5. Der Hill-Koeffizient beschreibt die Anstiegssteilheit der Kurve der Konzentration-Wirkungs-Beziehung. Er ist ein wichtiges Maß für die Kooperativität des Kanals, bzw. für die Anzahl der Liganden, die für eine vollständige Kanalöffnung benötigt werden.

Bei dieser Interpretation wären in makroskopischen Strömen 2 Liganden, in Einzelkanälen jedoch 3 Liganden nötig, um die maximale Öffnung des Kanals zu erreichen.

Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass sich die Konzentration-Wirkungs-Kurve auf der Basis von makroskopischen Strömen von der auf der Basis von Einzelkanalmessungen unterscheidet (Ruiz *et al.*, 1999). Diese Daten wurden hiermit von uns ebenfalls verifiziert.

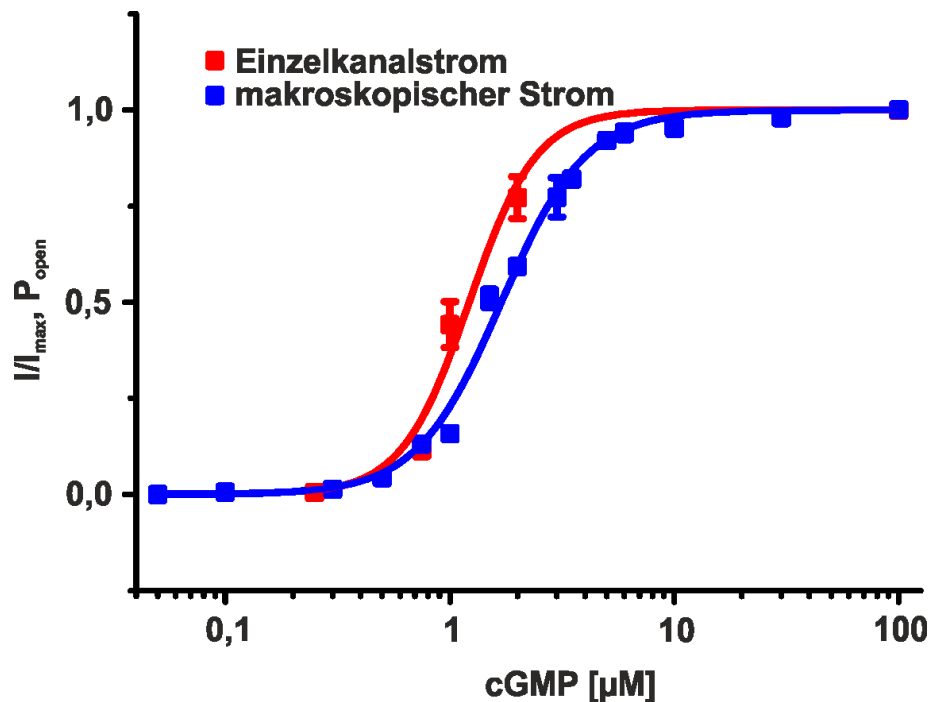


Abb. 11: Konzentration-Wirkungs-Beziehung für den homotetrameren CNG-Kanal. Rot: Offenwahrscheinlichkeit aus Einzelkanalmessungen, blau: normierte Ströme aus *Makropatches*. Linien: Fit der Hill-Gleichung (Gleichung 1). Die aus dem Fit ermittelten Werte für die EC_{50} betragen $1,69 \mu\text{M}$ cGMP für makroskopische Ströme sowie $1,72 \mu\text{M}$ cGMP für Einzelkanalströme. Die Werte für die Hill-Koeffizienten liegen bei 2,3 für makroskopische Ströme und 3,1 für Einzelkanalströme ($n = 9$).

Abbildung 12 zeigt die große Streuung der Einzelmessungen. Einzelkanäle zeigen deutlich verschiedene Offenwahrscheinlichkeiten. Diese Streuung der Offenwahrscheinlichkeit der Einzelkanäle hat in einem *Makropatch* für die Konzentration-Wirkungs-Kurve mitunter einen nicht unerheblichen Einfluss. Der für makroskopische Ströme ermittelte Hill-Koeffizient kann kleiner sein als der aus Einzelkanaldaten ermittelte. Dieses Ergebnis kann auf der Streuung der EC_{50} -Werte sowie auf einer Kooperativität zwischen den Kanälen in einem *Makropatch* beruhen. Die Kanäle beeinflussen sich dann in der Affinität zum Liganden und der Bindung.

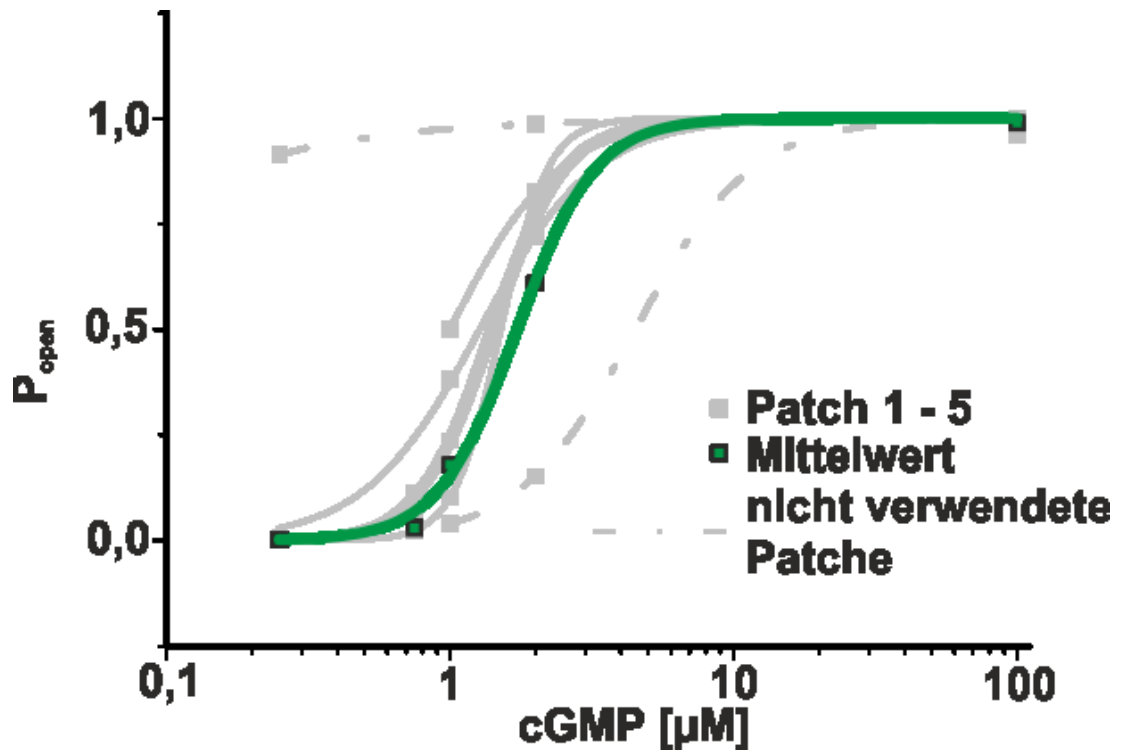


Abb. 12: Konzentration-Wirkungs-Beziehung für die Einzelkanalströme des homotetrameren CNGA2-Kanals. Grün: Mittelwert aus Einzelkanalmessungen, grau: Einzelmessungen. Linie: Fit mit der Hill-Gleichung (Gleichung 1). Die aus dem Fit ermittelten Werte sind in Tabelle 4 gezeigt. Die beiden gestrichelt dargestellten Linien, stellen Einzelkanalmessungen dar, die nicht in die Bestimmung der Konzentration-Wirkungs-Beziehung mit eingegangen sind, da ihre EC_{50} -Werte nicht bestimmbar sind (zu wenig Datenpunkte).

Tab. 4: EC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten, ermittelt aus den Einzelmessungen.

	EC_{50}	Hill
Mittelwert	1,72	3,1
Patch 1	1,4	3,4
Patch 2	1,3	2,1
Patch 3	1,0	2,2
Patch 4	1,5	5,3
Patch 5	1,5	3,4

4.1.3 Offenzeiten

Die Offen- und Geschlossenzeiten der CNGA2-Kanäle wurden aus den Histogrammen ermittelt. Mit der unter 3.5.2.3 beschriebenen Methode wurden die Offenzeiten bei den vier genannten nicht-sättigenden und der sättigenden Konzentration von 100 μM cGMP bestimmt.

Die Offenzeiten präsentieren sich als multiexponentielle Verteilungen. Die mathematische Approximation einer Kurve mit drei Zeitkonstanten konnte die Daten ausreichend gut beschreiben (Abb. 13). Das reduzierte Chi-Quadrat war gegenüber einem angepassten Kurvenverlaufes mit zwei Zeitkonstanten geringer. Mit vier Zeitkonstanten war die mathematische Approximation nicht bestimmt. Mit zunehmender cGMP-Konzentration steigen die Zeitkonstanten an.

Die ermittelten Zeitkonstanten für die vier nicht-sättigenden und die sättigende cGMP-Konzentration sind in Tabelle 5 aufgelistet.

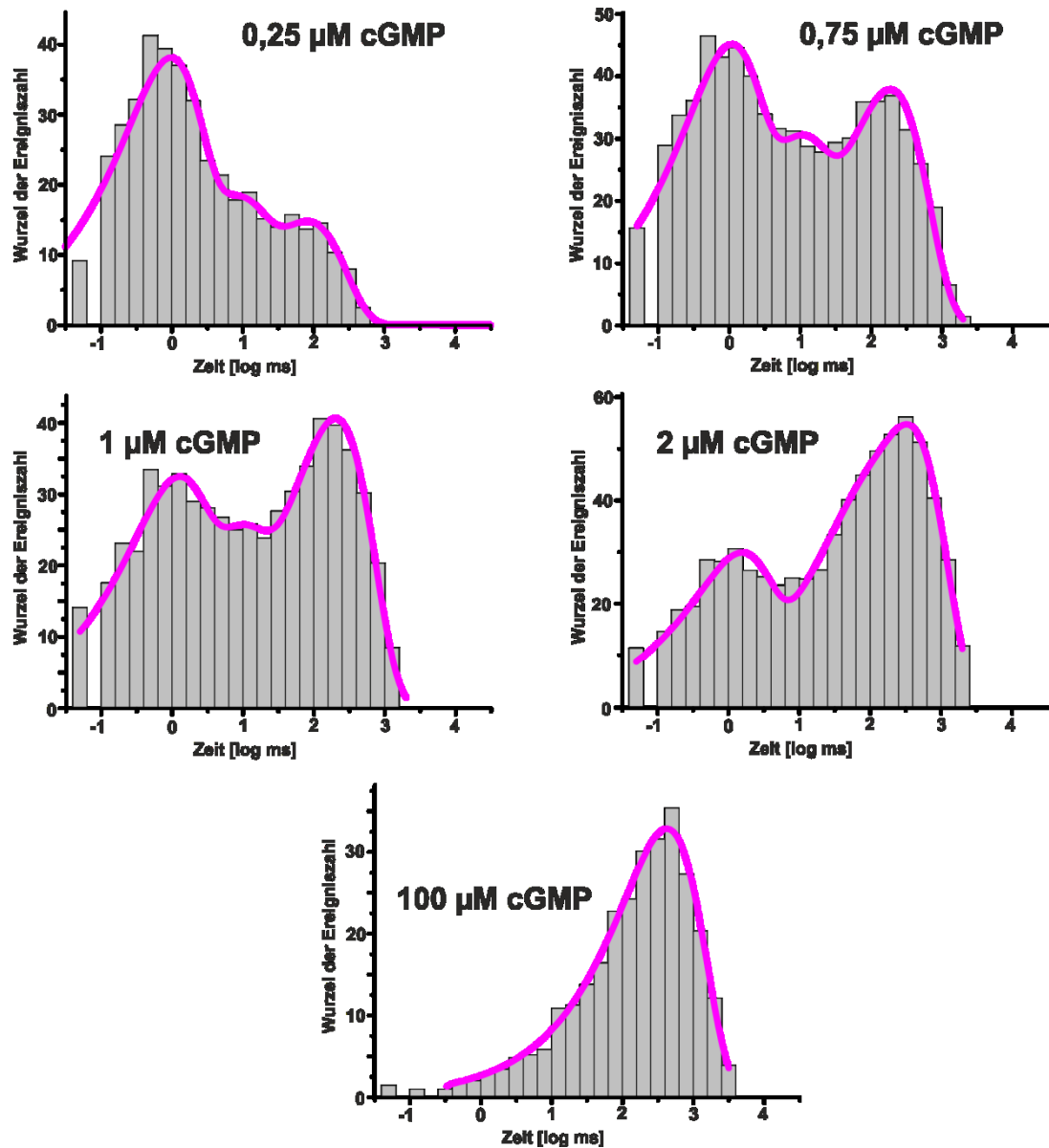


Abb. 13: Offenzeit-Histogramme des CNGA2-Kanals für steigende cGMP-Konzentrationen. Es wurden Histogramme der logarithmierten Offenzeiten mit konstanter Säulenbreite konstruiert. Auf der Ordinate wurde die Wurzel der Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Die Offenzeiten stellen sich als mehr-exponentielle Verteilung dar, die zumeist mit einer mathematischen Approximation mit 3 Zeitkonstanten beschrieben werden konnten. Für die Analyse wurde stets die erste Säule weggeschnitten, da diese aufgrund von Interferenzen zwischen der Säulen-Breite, der *Sampling*-Rate und der Filterfrequenz durch Artefakte überlagert ist.

Tab. 5: Zeitkonstanten für die Offenzeiten des homotetrameren CNGA2-Kanals.

cGMP [μ M]	τ_1 [ms]	τ_2 [ms]	τ_3 [ms]
0,25	$1,09 \pm 0,07$	$11,7 \pm 0,2$	$136,1 \pm 0,1$
0,75	$0,97 \pm 0,08$	$8,51 \pm 0,18$	$186,56 \pm 0,06$
1	$1,04 \pm 0,10$	$7,08 \pm 0,19$	$201,66 \pm 0,04$
2	$1,43 \pm 0,06$	$49,7 \pm 0,2$	$334,77 \pm 0,03$
100	$423,46 \pm 0,01$		

In Abbildung 14A ist die Abhängigkeit der Zeitkonstanten von der cGMP-Konzentration dargestellt. Mit steigender cGMP-Konzentration werden die Zeitkonstanten dezent langsamer. Je größer die cGMP-Konzentration umso stärker verschiebt sich die Mehrzahl der Ereignisse zu langen Offenzeiten hin (Abb. 14B). Die dominierende Zeitkonstante bei hohen Konzentrationen ist die langsamste.

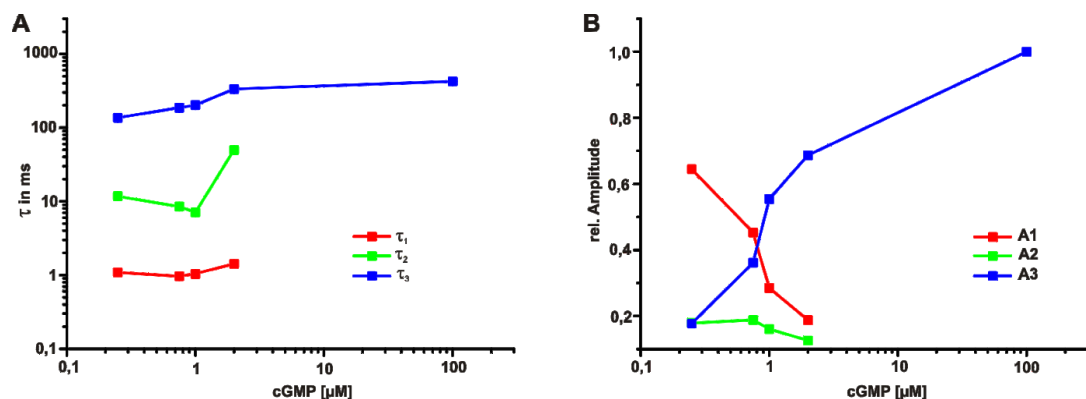


Abb. 14: Abhängigkeit der Zeitkonstanten und ihre relativen Amplitudenanteile von der cGMP-Konzentrationen. **A)** Die Zeitkonstanten nehmen mit steigenden Liganden-Konzentrationen leicht zu. **B)** Die relativen Amplituden dieser Zeitkonstanten scheinen in keinem direkten Zusammenhang zu dem Anstieg der Zeitkonstanten zu stehen. Allerdings verschiebt sich die Mehrzahl der Ereignisse mit zunehmender cGMP-Konzentration zu der langsamsten Zeitkonstante (blau).

4.1.4 Geschlossenzeiten

Identisch zu den Offenzeiten, wurden die Geschlossenzeiten der vier nicht-sättigenden und der sättigenden cGMP-Konzentration bestimmt.

Auch die Darstellung der Geschlossenzeiten ergibt eine multiexponentielle Verteilung. Ein angepasster Kurvenverlauf mit drei Zeitkonstanten konnte die Daten hinreichend gut beschreiben (Abb. 15). Das reduzierte Chi-Quadrat war für die mathematische Approximation mit drei Zeitkonstanten geringer als die angepassten Kurven-Ergebnisse mit zwei Zeitkonstanten. Mit steigender Liganden-Konzentration wurden die Zeitkonstanten schneller.

Die ermittelten Zeitkonstanten für die Geschlossenzeiten des homotetrameren CNG-Kanals sind in Tabelle 6 gezeigt.

Bei geringen cGMP-Konzentrationen können alle drei Zeitkonstanten klar voneinander getrennt werden. Mit steigender cGMP-Konzentration wird die zweite Zeitkonstante häufig von den breiten Streuungen der beiden anderen Zeitkonstanten überlagert und ist dadurch nicht klar bestimmbar.

Mit Näherung der cGMP-Konzentration an die Sättigung (100 μ M cGMP) verschiebt sich die Mehrzahl der Ereignisse zu der kleinsten Zeitkonstante, da die Kanal zu 99,8 % geöffnet ist und der geöffnete Zustand nur von kurzen Schließungen unterbrochen wird.

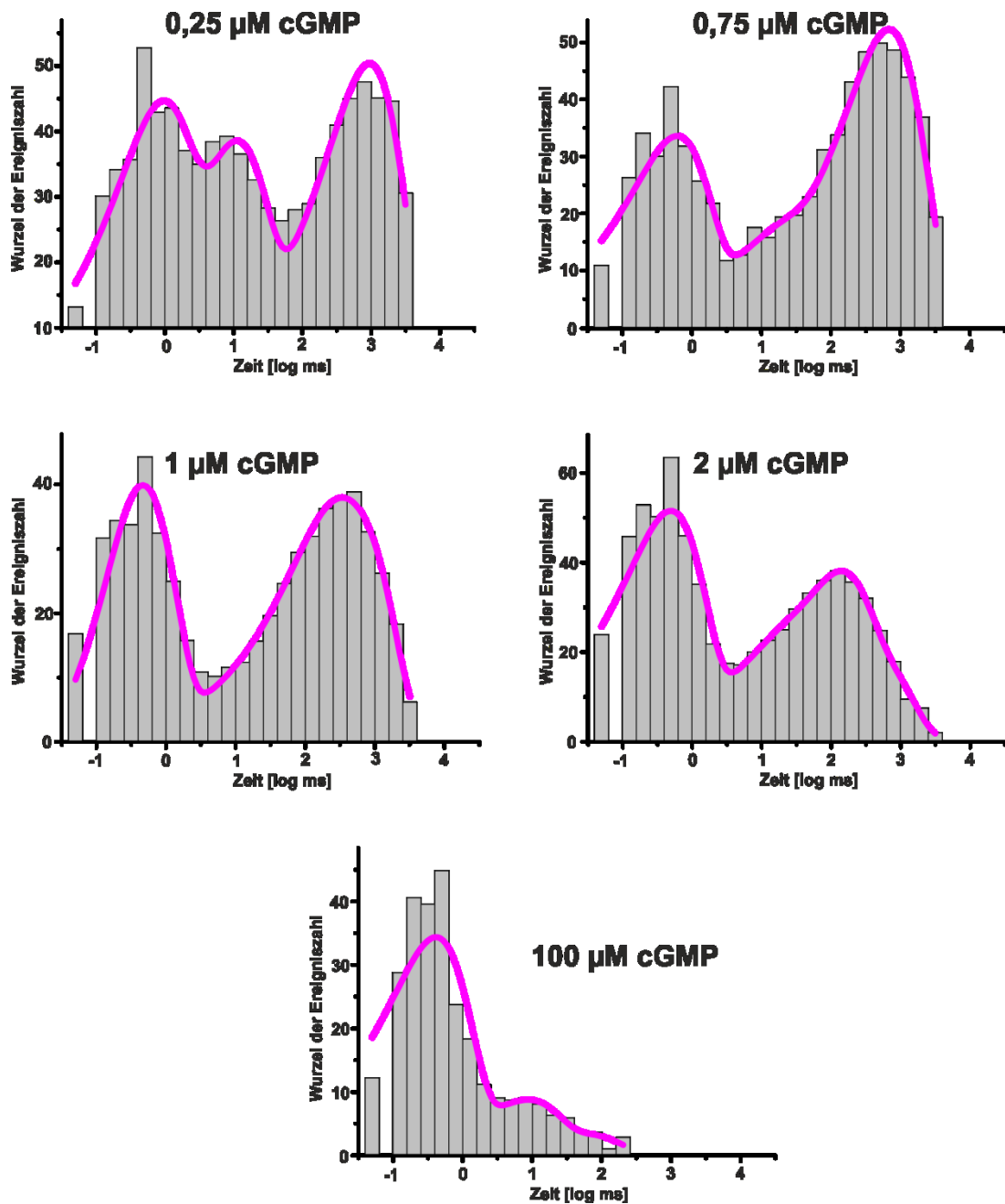


Abb. 15: Geschlossenzeit-Histogramme für steigende cGMP-Konzentrationen. Die Geschlossenzeiten lassen sich als mehr exponentielle Verteilungen darstellen, in denen regulär eine mathematische Approximation mit drei Zeitkonstanten die Daten ausreichend gut beschreiben konnte. Die Histogramme sind nach steigenden cGMP-Konzentrationen angeordnet.

Tab. 6: Zeitkonstanten für die Geschlossenzeiten des homotetrameren CNG-Kanals.

cGMP [μ M]	τ_1 [ms]	τ_2 [ms]	τ_3 [ms]
0,25	$0,82 \pm 0,09$	$10,55 \pm 0,09$	$950,04 \pm 0,05$
0,75	$0,60 \pm 0,07$	$13,2 \pm 0,5$	$675,34 \pm 0,04$
1	$0,52 \pm 0,06$	$169,99 \pm 0,43$	$534,60 \pm 0,13$
2	$0,49 \pm 0,07$	$77,38 \pm 0,27$	$293,73 \pm 0,22$
100	$0,4 \pm 0,1$	$8,17 \pm 0,64$	$53,69 \pm 1,68$

In Abbildung 16A sind die Abhängigkeiten der Zeitkonstanten von der cGMP-Konzentration aufgetragen. Der Verlauf zeigt einen stetigen Abfall der kleinen und großen Zeitkonstanten an, je größer die cGMP-Konzentration wird. Die mittlere Zeitkonstante durchläuft bei $1 \mu\text{M}$ cGMP, also nahe dem EC_{50} -Wert, ein Maximum. Mit steigender cGMP-Konzentration nimmt die Häufigkeit der Schließungen ab und die einzelnen Schließungsereignisse werden kürzer. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf ein komplexes Schaltverhalten hin.

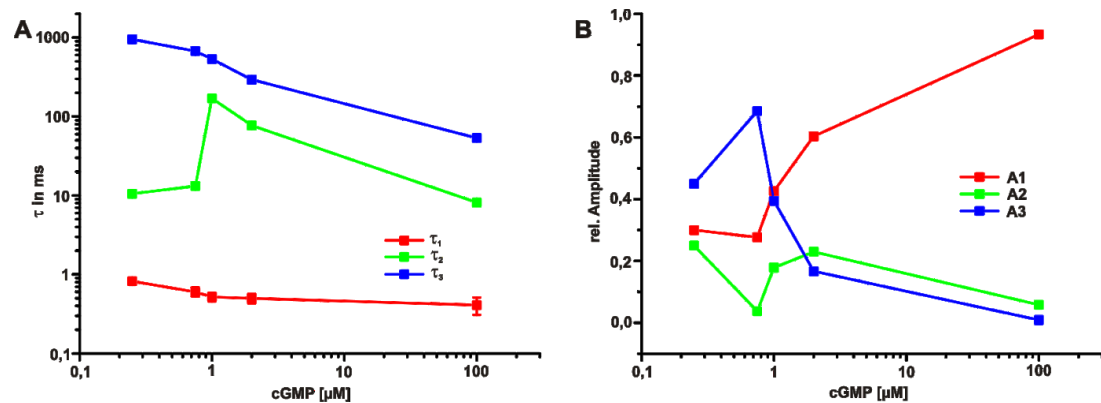


Abb. 16: Verteilung der Zeitkonstanten der Geschlossenzeiten und ihre relativen Amplituden als Funktion der cGMP-Konzentration. **A)** Alle drei Zeitkonstanten nehmen mit steigender cGMP-Konzentration $\geq 1 \mu\text{M}$ cGMP ab. **B)** Die relativen Amplituden dieser Zeitkonstanten stehen in keinem direkten Zusammenhang zu dem Verlauf der Zeitkonstanten über die cGMP-Konzentration. Die Mehrzahl der Ereignisse verschiebt sich mit zunehmender cGMP-Konzentration zur kleinsten Zeitkonstante (rot).

4.1.5 Beziehung zwischen aufeinanderfolgenden Offenzeiten und Geschlossenzeiten

Um eine mögliche Korrelation zwischen benachbarten Offenzeit und Geschlossenzeit zu identifizieren, wurde die in Abbildung 17 dargestellte Analyse durchgeführt. Ein Zeitpaar, bestehend aus einer Offenzeit und der darauf folgenden Geschlossenzeit, wurde gemeinsam betrachtet und in ein 2D-Histogramm eingetragen. Die Ergebnisse für die vier nicht-sättigenden Liganden-Konzentrationen sind in Abbildung 17 gezeigt. Die Farbskala gliedert sich von schwarz (keine Ereignisse) über rot zu gelb (viele Ereignisse).

Die Ergebnisse der 2D-Histogramme zeigen, dass der Zusammenhang zwischen Offen- und Geschlossenzeiten konzentrationsabhängig ist. Während es bei geringen cGMP-Konzentrationen (z.B. 0,25 μM) hauptsächlich kurze Öffnungen mit unmittelbar folgenden langen Schließungen gibt, verschiebt sich dieses Verhältnis mit steigenden Konzentrationen zu langen Öffnungen und direkt folgenden kurzen Schließungen. Dies spiegelt zusätzlich den Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals bei steigenden Liganden-Konzentrationen wieder. Die intermediären cGMP-Konzentrationen, um den EC_{50} -Wert schwankend (1,7 μM cGMP), zeigen eine mehr heterogene Verteilung. Es sind alle vier möglichen Kombinationen an Zeitintervallen vertreten. Der Fall von kurzen Öffnungen und kurzen Schließungen tritt nur relativ selten ein. In Abschnitt 4.1.3 und 4.1.4 wurden jedoch jeweils drei Zeitkonstanten für Offen- und Geschlossenzeiten ermittelt. Die Analyse hier zeigt, dass kurze und lange Zeiten hauptsächlich in Kombination auftreten. Bei intermediären Konzentrationen gibt es häufiger auch lange Offen- und lange Geschlossenzeiten. Kombinationen, gepaarte Offen- und Geschlossenzeiten („Flickern“) sind praktisch nicht vorhanden. Die intermediären Offenzeiten bei niedrigen Konzentrationen treten hauptsächlich in Kombination mit kurzen Geschlossenzeiten auf. Es gibt praktisch keine Paarung von intermediären Offen- und Geschlossenzeiten (keine Punkte in der Mitte des Graphen).

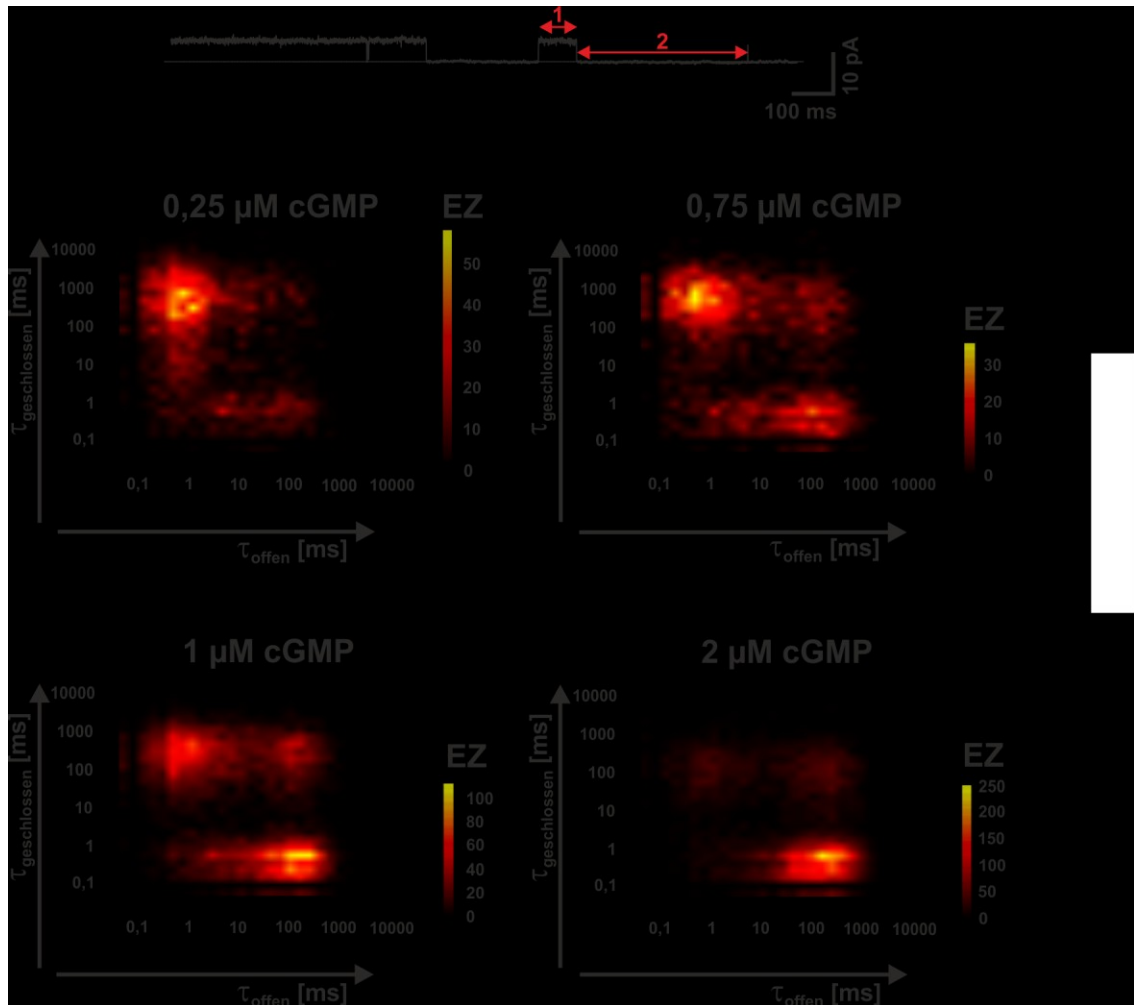


Abb. 17: Analyse der Korrelation zwischen Offenzeiten und ihren nachfolgenden Geschlossenzeiten. Ein Zeitpaar, bestehend aus einer Offenzeit und der ihr nachfolgenden Geschlossenzeit, wurde der cGMP-Konzentration zugehörig in ein 2D-Histogramm aufgetragen, um eine mögliche Korrelation zwischen Offen- und Geschlossenzeiten nachzuweisen. **A)** zeigt das Verfahren. (1) Dauer der Offenzeit, (2) Dauer der nachfolgenden Geschlossenzeit. Die Farbskala entspricht der Anzahl der Ereignisse (EZ).

Der gleiche Ansatz zur Untersuchung einer Korrelation zwischen Offen- und Geschlossenzeiten wurde auch in reziproker Weise durchgeführt. Hierzu wurden die Geschlossenzeiten und die ihr voraus gegangene Offenzeit als ein Zeitpaar in ein 2D-Histogramm aufgetragen (Histogramme nicht gezeigt). Für ein reversibles Markov-System im Gleichgewicht sollten die Zeitverläufe unabhängig von der Analyserichtung identische Ergebnisse ergeben. Um dies zu testen, wurden die Unterschiede aus den 2D-Histogrammen offen/geschlossen („vorwärts“) und geschlossen/offen („rückwärts“) analysiert. Die

Differenzen zwischen den beiden 2D-Histogrammen sind in Abbildung 18 für unterschiedliche cGMP-Konzentrationen dargestellt.

Das Ergebnis erscheint für alle cGMP-Konzentrationen unstrukturiert (Abb. 18). Lediglich die Rauschamplituden scheinen mit der Ereignisanzahl zu korrelieren. Es gibt keinen Bereich mit klaren positiven (blau) oder negativen (rot) Ausschlägen. Um statistisch zu testen, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den „Vorwärts“- und „Rückwärts“-Histogrammen gibt, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Das Chi-Quadrat wurde nach Gleichung 5 (siehe 3.5.2.6) bestimmt. Dabei wurden nur Bins berücksichtigt, die in beiden Richtungen mehr als 5 Ereignisse aufweisen. Die Anzahl dieser Ereignisse ist die Anzahl der Freiheitsgrade (mittels Gleichung 6 ermittelt, siehe 3.5.2.6). Liegt der ermittelte Z-Wert über den Faktor 1,96, besteht ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von 0,05. Für 0,25, 0,75 und 1 μM waren die Unterschiede deutlich nicht signifikant. Für 2 μM lagen die Unterschiede nur knapp über der Signifikanzgrenze. Es muss dabei jedoch beachtet werden, dass diese Werte dennoch deutlich unterhalb in der Literatur beschriebener simulierter Daten für partielle irreversible Reaktionen lagen. Wir gehen daher davon aus, dass die Reaktionen auch für die Konzentration von 2 μM cGMP reversibel sind, auch wenn nicht das gleiche Kontingenzniveau erreicht wurde.

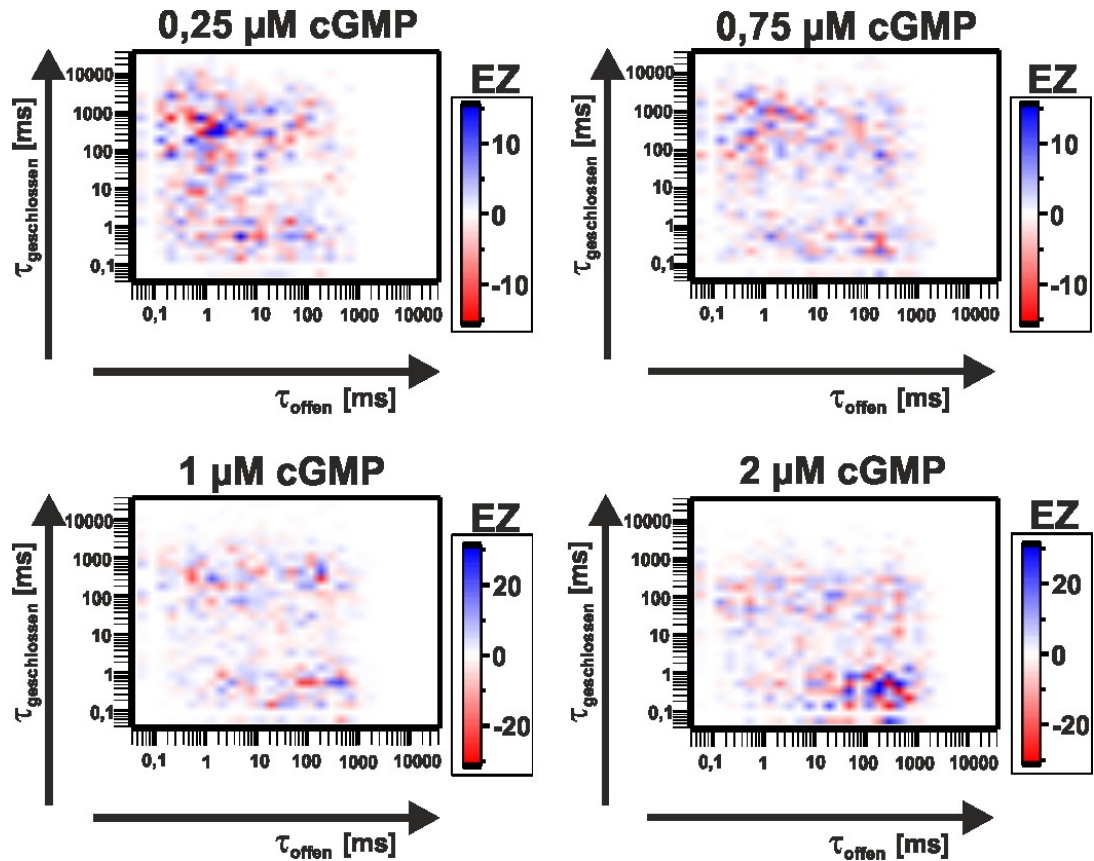


Abb. 18: Analyse zur Bestimmung der mikroskopischen Reversibilität. 2D-Histogramme in dem die Zeitpaare Offenzeit plus nachfolgende Geschlossenzeit gegen Geschlossenzeit plus voraus gegangene Offenzeit subtrahiert dargestellt sind.

Mit blau sind positive Amplitudenereignisse („Vorwärts-Reaktion“) und mit rot negative Amplitudenereignisse („Rückwärts“-Reaktion) dargestellt. In der Nähe eines stark positiven Signals sollte sich zum Nachweis der mikroskopischen Reversibilität ebenfalls ein stark negatives Signal befinden.

4.1.6 Modellierung des homotetrameren CNGA2-Kanals

Mit Hilfe der frei erhältlichen Qub-Software können Einzelkanaldaten analysiert und global mittels kinetischen Modellen beschrieben werden.

Um ein geltendes Modell für den homotetrameren CNGA2-Kanal zu definieren, wurden zunächst die bisher bestehenden und publizierten Modelle mit den hier erhobenen Daten verglichen.

Die Veröffentlichung von Li und Lester aus dem Jahr 1999 beinhaltet zwei Modelle für den olfaktorischen homotetrameren CNG-Kanal. Die Daten in dieser Veröffentlichung wurden bei -60 mV erhoben. Die durch cGMP induzierte Amplitude beträgt ca. 2 pA (Li und Lester, 1999). Die Leitfähigkeit des Kanals beträgt ebenfalls 50 pS. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der globalen Approximation für die in dieser Arbeit erhobenen Einzelkanaldaten mit dem einfachen CCCOO-Modell von Li und Lester dargestellt. Die ermittelten Werte der Geschwindigkeitskonstanten und der daraus resultierenden Gleichgewichtskonstanten sind in Tabelle 7 gezeigt.

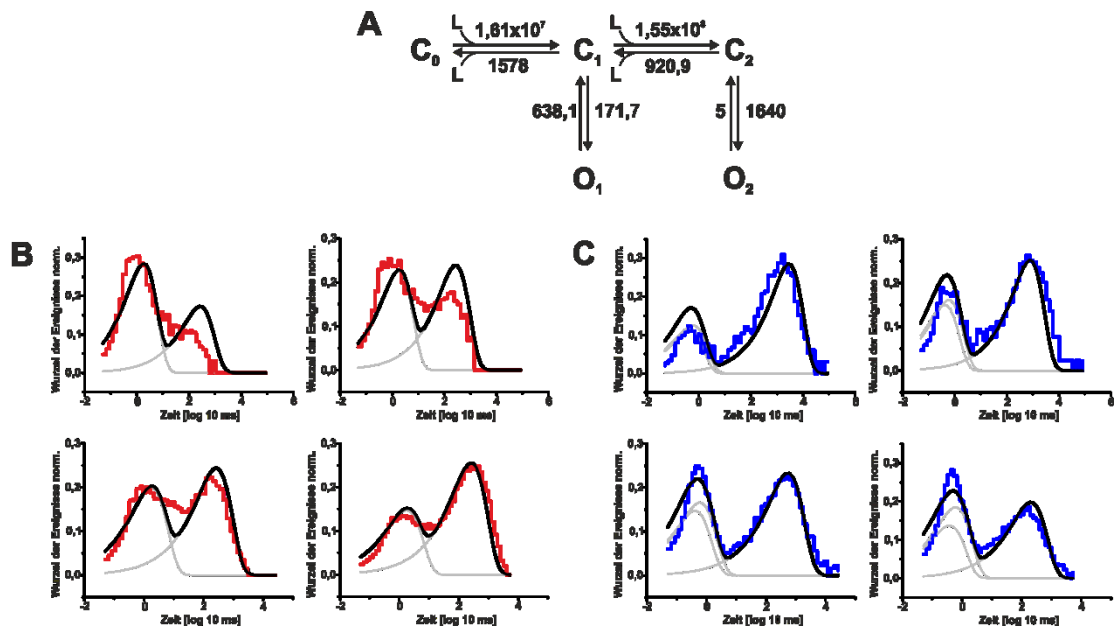


Abb. 19: Globale Approximation der Einzelkanaldaten für das von Li und Lester (1999) publizierte Modell (1). **A)** Modell mit Geschwindigkeitskonstanten für die Übergänge. Die Hin-Reaktionen der geschlossenen Zustände ($C_0 \rightarrow C_1 \rightarrow C_2$) sind konzentrationsabhängig und in $M^{-1} s^{-1}$ angegeben. Die restlichen Geschwindigkeitskonstanten sind in s^{-1} angegeben. **B)** Zeithistogramme (rote Linie) und die global angepassten Kurven (schwarze Linie) für die Offenzeiten. **C)** Zeithistogramme (blaue Linie) und die global approximierten Kurven (schwarze Linie) der Geschlossenzeiten.

Die Ergebnisse in Abbildung 19A zeigen die durch den globalen Fit ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die im Modell festgelegten Übergänge. Die Hinreaktionen der geschlossenen Zustände sind Liganden-bindende Schritte und somit konzentrationsabhängig. Der Öffnungsschritt für den zweifach ligandierten Kanal (C_2) in den geöffneten Zustand (O_2) ist mit einer Geschwindigkeitskonstante von $1640 s^{-1}$ um das

zehnfache schneller als der Schritt für einen einfach ligandierten Übergang ($C_1 \rightarrow O_1$). Bei der Betrachtung der Zeithistogramme und der auf diese gefitteten Kurven zeigt sich, dass das Modell mit nur zwei offenen Zuständen nicht ausreichend ist, um die hier erhobenen Einzelkanaldaten adäquat zu beschreiben. Die Kurven für die Geschlossenzeiten passen sich bedeutend besser dem Verlauf der Histogramme an.

Tab. 7: Geschwindigkeitskonstanten und die Gleichgewichtskonstanten für das Modell 1 von Li und Lester (1999).

Übergänge	$k_{\text{Hinreaktion}}$	$k_{\text{Rückreaktion}}$	$K_{\text{Gleichgewicht}}$
$C_0 \leftrightarrow C_1$	$1,61 \times 10^7 \pm 5,87 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1578,0 \pm 99,3 \text{ s}^{-1}$	$10,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
$C_1 \leftrightarrow C_2$	$1,55 \times 10^8 \pm 1,10 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$920,9 \pm 21,4 \text{ s}^{-1}$	$1,68 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
$C_1 \leftrightarrow O_1$	$171,7 \pm 11,6 \text{ s}^{-1}$	$638,1 \pm 12,3 \text{ s}^{-1}$	0,27
$C_2 \leftrightarrow O_2$	$1640,00 \pm 27,95 \text{ s}^{-1}$	$5,00 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$	328

Damit die Unterschiede zwischen den durch eine globale Approximation ermittelten Ergebnissen und den aus der Literatur beschriebenen Daten (Li und Lester, 1999) deutlicher hervor gehoben werden können, wurden die beiden Datensätze miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieses Vergleiches sind in Abbildung 20 dargestellt.

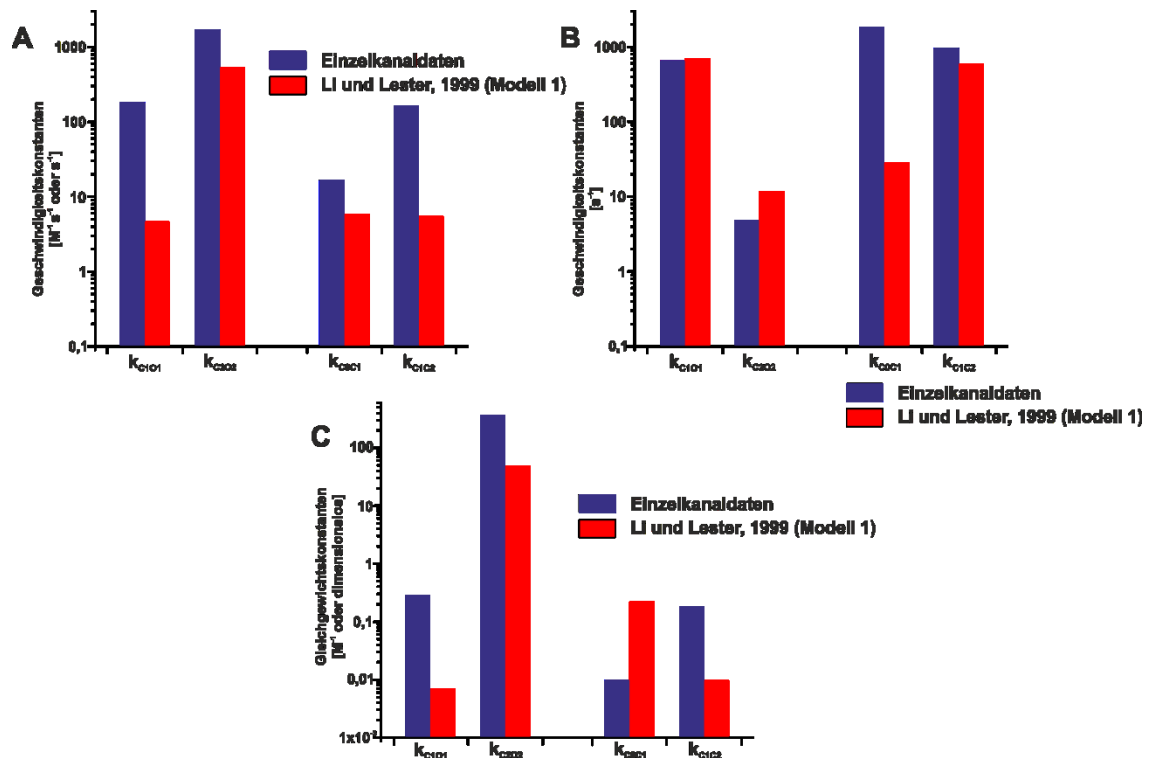


Abb. 20: Vergleich zwischen Einzelkanaldaten (blau) und den 1999 von Li und Lester (rot) publizierten Daten. **A)** Vergleich der Hin-Reaktionen, **B)** Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten für die Rück-Reaktionen, **C)** Vergleich der Gleichgewichtskonstanten.

Aus den Vergleichen der Geschwindigkeitskonstanten sind deutliche Unterschiede erkennbar. Die Geschwindigkeitskonstanten der Hin-Reaktionen der hier erhobenen Einzelkanaldaten sind teilweise um 0,5 bis 1,5 Größenordnungen größer. Die Geschwindigkeitskonstante der Rück-Reaktion (1) für den Übergang aus dem ersten offenen Zustand (O_1) in den ersten geschlossenen Zustand (C_1) ist nahezu identisch. Die anderen Übergänge zeigen deutliche Unterschiede mit Differenzen bis zu 2 Größenordnungen. Um abzuschätzen, wie stark die Konstanten sich wirklich im Gesamtmodell unterscheiden, wurden die Gleichgewichtskonstanten der Übergänge ermittelt und in ein Histogramm aufgetragen. Abbildung 20C zeigt diesen Vergleich. Hier sind die Unterschiede deutlich zu erkennen, die sich mit einer Veränderung bis zu einer Größenordnung bemerkbar machen.

Das ebenfalls von Li und Lester (1999) publizierte zweite Modell wurde mit Hilfe der gleichen Messungen wie Modell 1 (siehe oben) erstellt. Dieses Modell wurde ebenso mittels der Qub-Software einer Prüfung unterzogen und global auf die erhobenen Einzelkanaldaten angepasst. Das Ergebnis ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Werte der Geschwindigkeitskonstanten und ihre Gleichgewichtskonstanten sind in Tabelle 8 gezeigt.

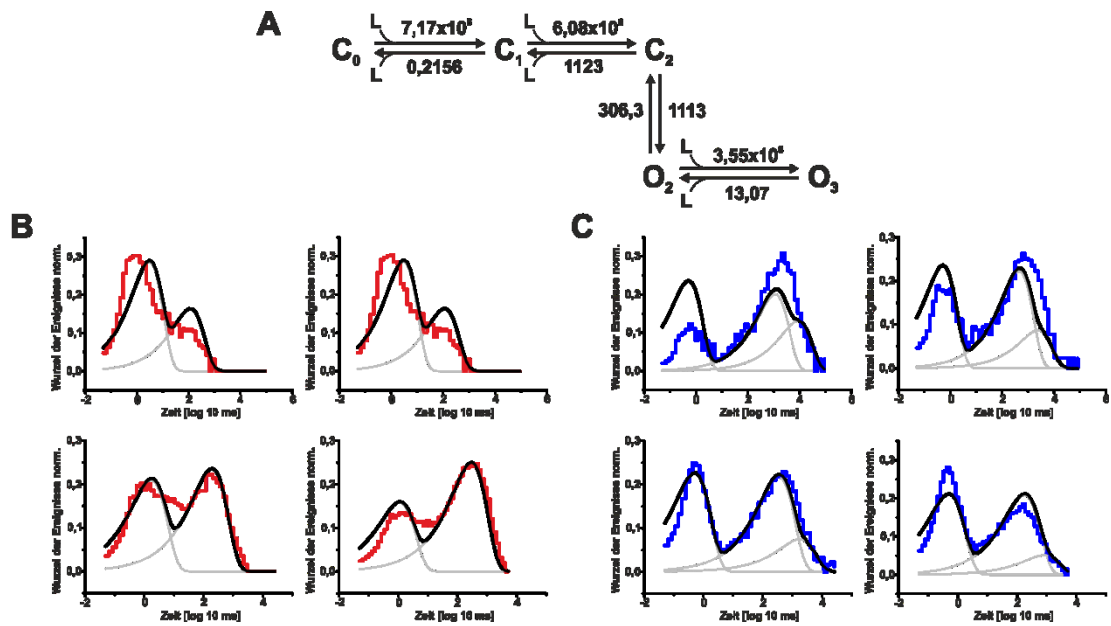


Abb. 21: Globale Approximation der Einzelkanaldaten für das von Li und Lester 1999 publizierte Modell (2). **A)** Modell mit Geschwindigkeitskonstanten für die Übergänge. Die Hin-Reaktionen der geschlossenen Zustände ($C_0 \rightarrow C_1 \rightarrow C_2$) sowie die Hinreaktion der offenen Zustände ($O_2 \rightarrow O_3$) sind konzentrationsabhängig und werden in $M^{-1} s^{-1}$ angegeben. Die restlichen Geschwindigkeitskonstanten sind in s^{-1} angegeben. **B)** Zeithistogramme (rote Linie) und die global angepassten Kurven (schwarze Linie) für die Offenzeiten. **C)** Zeithistogramme (blaue Linie) und die global approximierten Kurven (schwarze Linie) der Geschlossenzeiten.

Tab. 8: Geschwindigkeitskonstanten und Gleichgewichtskonstanten für das Modell 2 von Li und Lester (1999).

Übergänge	$k_{\text{Hinreaktion}}$	$k_{\text{Rückreaktion}}$	$K_{\text{Gleichgewicht}}$
$C_0 \leftrightarrow C_1$	$7,17 \times 10^5 \pm 5,39 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$	$0,2156 \pm 0,0247 s^{-1}$	$3,3 \times 10^6 M^{-1}$
$C_1 \leftrightarrow C_2$	$6,08 \times 10^6 \pm 1,20 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$	$1123,0 \pm 17,8 s^{-1}$	$5,4 \times 10^2 M^{-1}$
$C_2 \leftrightarrow O_2$	$1113,0 \pm 17,7 s^{-1}$	$306,3 \pm 6,7 s^{-1}$	3,6
$O_2 \leftrightarrow O_3$	$3,55 \times 10^8 \pm 9,36 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$	$13,07 \pm 0,24 s^{-1}$	$2,7 \times 10^7 M^{-1}$

Die Ergebnisse in Abbildung 21A zeigen die durch die global angepasste Kurve ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die im Modell festgelegten Übergänge. Bei diesem Modell geht man von der Annahme aus, dass zwei Liganden nötig sind um den Kanal zu öffnen. Ein dritter bindender Ligand an den bereits geöffneten Kanal stabilisiert den Kanal im geöffneten Zustand. Bei der Betrachtung der Zeithistogramme (Abb. 21B (rote Linien) und C (blaue Linien)) und der an diese Histogramme angepassten Kurven (Abb. 21B und C (schwarze Linie)) zeigt sich, dass das Modell nicht ausreichend ist, um die hier erhobenen Einzelkanaldaten ausreichend gut zu beschreiben. Die angepassten Kurven für die Offenzeiten können vorwiegend die kurzen schnellen Offenzeiten nicht gut beschreiben. Die Histogramme der Offenzeiten zeigen deutlich eine dritte in der Mitte gelegene Zeitkonstante, die mit einem Modell mit zwei Offenzuständen nicht beschrieben werden kann. Ein Modell mit mindestens einem zusätzlichen Offenzustand sollte die Daten besser beschreiben können. Die angepassten Kurven für die Geschlossenzeiten stimmen besonders für geringe Ligandenkonzentrationen nicht mit den Daten der Histogramme überein. Kurze schnelle Schließungen konnten bei geringen Konzentrationen nicht häufig beobachtet werden. Die durch das Modell ermittelte Kurve sagt mehr kurze Ereignisse voraus. Es bleibt festzuhalten, dass auch dieses Modell von Li und Lester 1999 nicht ausreichend ist, um die in dieser Arbeit gemessenen Einzelkanaldaten zu beschreiben.

Um die Unterschiede zwischen den durch eine globale Approximation ermittelten Ergebnissen und den aus der Literatur beschriebenen Daten (Li und Lester, 1999) deutlicher hervorzuheben, wurden die beiden Datensätze miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieses Vergleiches sind in Abbildung 22 dargestellt.

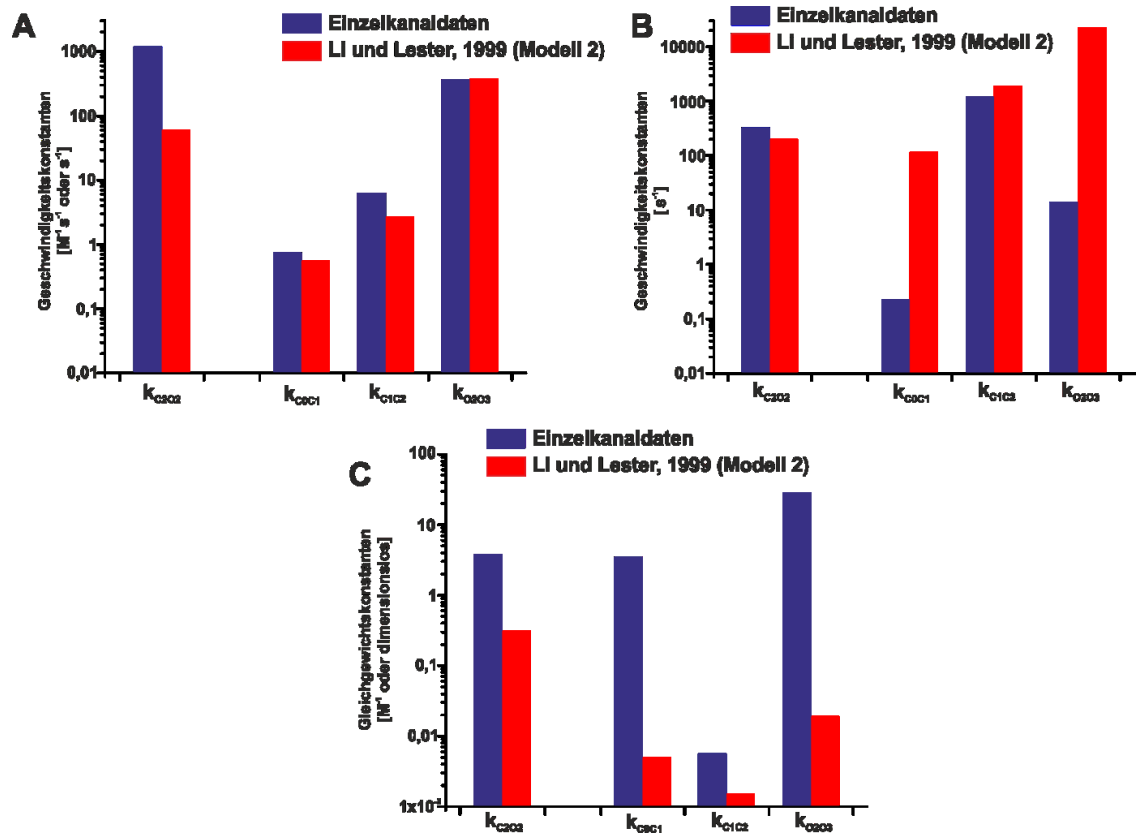


Abb. 22: Vergleich der hier gezeigten Einzelkanalaten mit den von Li und Lester (1999) publizierten Daten für das Modell (2). **A)** Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten für die Hin-Reaktionen, **B)** Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der Rück-Reaktionen, **C)** Vergleich der Gleichgewichtskonstanten.

Aus den Vergleichen der Geschwindigkeitskonstanten sind einige Unterschiede erkennbar (Abb. 22). Es sind Unterschiede mit bis zu 3 Größenordnungen vorhanden (wie für die Rückreaktion von k_{C0C1} und k_{O2O3}). Am deutlichsten sind die Unterschiede bei der Gegenüberstellung der Gleichgewichtskonstanten. Hier weichen die Werte für die in dieser Arbeit erhobenen Einzelkanalaten alle deutlich von den publizierten Daten ab. Es sind Unterschiede von nahezu 4 Größenordnungen bei den Gleichgewichtskonstanten vorhanden (Abb. 22).

Die Zeithistogramme für die Offen- und Geschlossenzeiten in den Abbildungen 13 und 15 lassen sich am besten mit der Approximation einer Kurve für drei Zeitkonstanten beschreiben. Die Ergebnisse für die globale Analyse mit den beiden Modellen von Li und Lester konnten bereits zeigen, dass wie zu erwarten zwei Offenzustände die in dieser Arbeit gezeigten Einzelkanalaten nicht zufriedenstellend beschreiben. Aus diesem Grund wurden die beiden Modelle zusammengefasst, wodurch sich drei Offen- und drei

Geschlossenzustände ergeben. Anschließend wurde eine globale Analyse mit diesem Modell durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 gezeigt. Die Werte der Geschwindigkeitskonstanten und deren Fehler sind in Tabelle 9 angegeben.

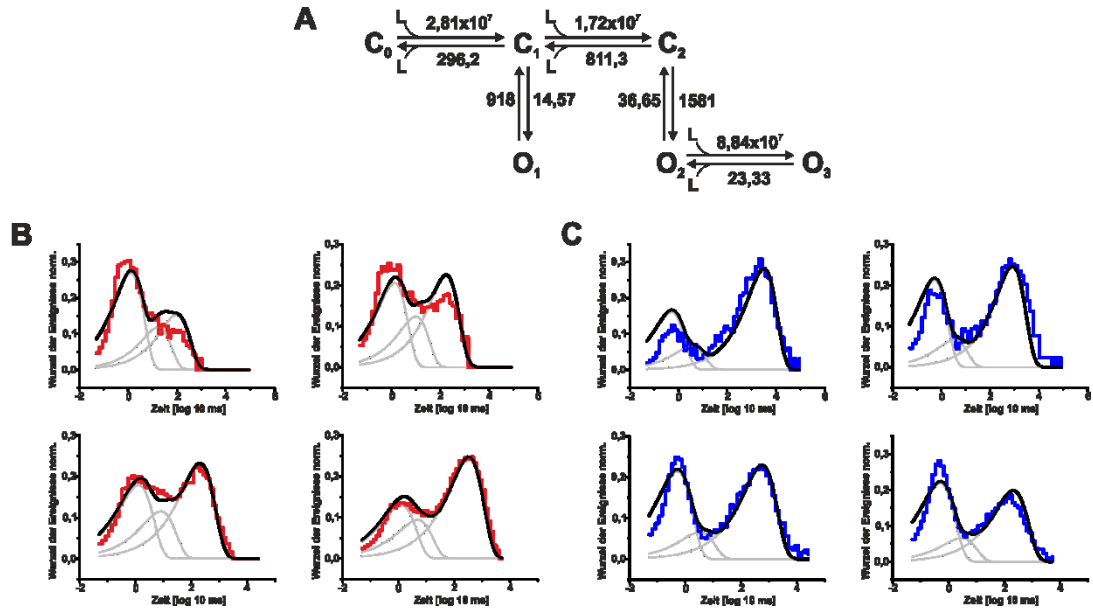


Abb. 23: Globale Analyse der Einzelkanalaten für ein Modell mit drei offenen und drei geschlossenen Zuständen. **A)** Modell mit den global ermittelten Geschwindigkeitskonstanten. **B)** Zeithistogramme der Offenzeiten (rote Kurve : Ereignisse, schwarze Linie: global angepasste Kurve) **C)** Zeithistogramme der Geschlossenzeiten (blaue Kurve: Ereignisse, schwarze Linie: global angepasste Kurve).

Tab. 9: Geschwindigkeitskonstanten und Gleichgewichtskonstanten für das kombinierte Modell aus den Modellen 1 und 2 von Li und Lester (1999).

Übergänge	$k_{\text{Hinreaktion}}$	$k_{\text{Rückreaktion}}$	$K_{\text{Gleichgewicht}}$
$C_0 \leftrightarrow C_1$	$2,81 \times 10^7 \pm 2,15 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$296,20 \pm 59,05 \text{ s}^{-1}$	$9,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$
$C_1 \leftrightarrow C_2$	$1,72 \times 10^7 \pm 2,37 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$811,30 \pm 16,96 \text{ s}^{-1}$	$2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$
$O_2 \leftrightarrow O_3$	$8,84 \times 10^7 \pm 5,52 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$23,33 \pm 0,85 \text{ s}^{-1}$	$3,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
$C_1 \leftrightarrow O_1$	$14,57 \pm 2,1 \text{ s}^{-1}$	$918,0 \pm 19,9 \text{ s}^{-1}$	0,016
$C_2 \leftrightarrow O_2$	$1581,0 \pm 24,9 \text{ s}^{-1}$	$36,65 \pm 1,72 \text{ s}^{-1}$	43,14

Die Ergebnisse in Abbildung 23A zeigen die durch eine global angepasste Kurve ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die im Modell festgelegten Übergänge.

Der Öffnungsschritt für den zweifach ligandierten Zustand (C_2) in den geöffneten Zustand (O_2) ist mit einer Geschwindigkeitskonstante von 1581 s^{-1} um das hundertfache schneller als der Schritt für einen einfach ligandierten Übergang ($C_1 \rightarrow O_1$).

Abbildung 23B zeigt die Zeithistogramme für die Offenzeiten (rote Linien) und die angepassten Kurven (schwarze Linien). Für die größeren Liganden-Konzentrationen passt sich die Kurve den Daten sehr gut an. Die geringen Konzentrationen können auch mit diesem Modell noch nicht ausreichend gut beschrieben werden.

Abbildung 23C zeigt die Zeithistogramme der Geschlossenzeiten (blaue Linien) und die auf diese Zeiten angepassten Kurven-Ergebnisse (schwarze Linie). Auch hier ist bei geringen Liganden-Konzentrationen noch ein Unterschied erkennbar. Die Kurven zeigen deutliche Abweichungen von den Zeithistogrammen.

Dennoch beschreibt dieses Modell die Daten bedeutend besser als die zwei zuvor gezeigten Modelle. Allerdings gibt es auch hier noch deutliche Abweichungen zwischen den Einzelkanaldaten und den Modelldaten.

Als nächstes wurde das Modell von Nache *et al.*, 2005 zur Beschreibung der Daten verwendet. Die Daten des zugrunde liegende Modelles von Nache *et al.* (2005) wurden ebenfalls bei +100 mV erhoben, stammen jedoch aus makroskopischen Datensätzen. Zur

Aktivierung des Kanals wurde auch hier cGMP eingesetzt. Die Ergebnisse der globalen Approximation sind in Abbildung 24 gezeigt.

Die Werte der Geschwindigkeitskonstanten und deren Fehler sind in Tabelle 10 angegeben.

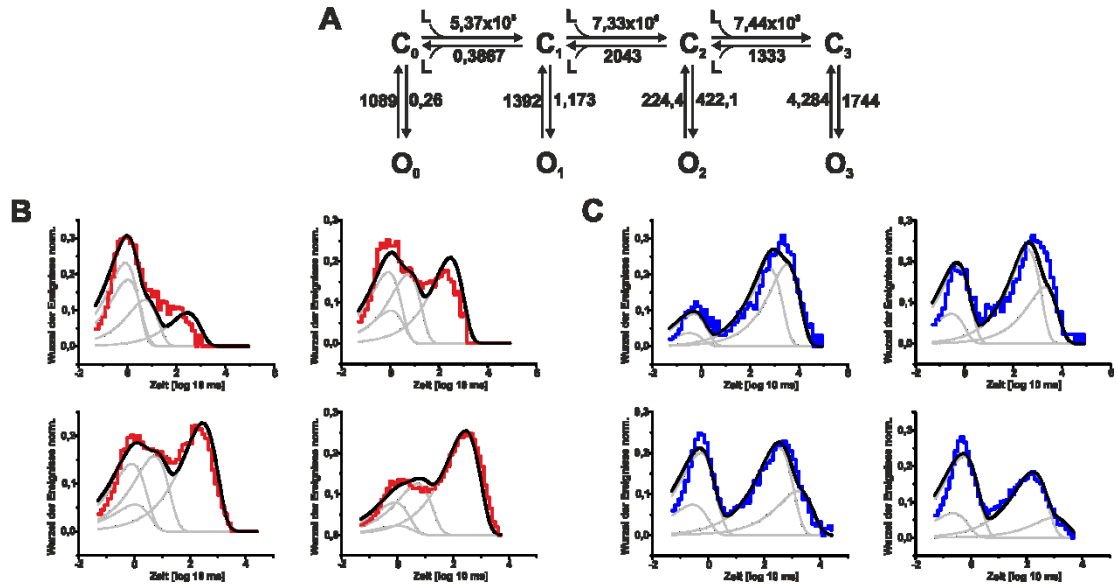


Abb. 24: Global angepasste Kurven-Verläufe für die in dieser Arbeit erhobenen Einzelkanaldaten auf der Basis des Modelles von Nache *et al.* (2005). **A)** Modell mit den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten. **B)** Zeithistogramme für die Offenzeiten (rote Linien) und die angepassten Kurven (schwarze Linie) **C)** Zeithistogrammen für die Geschlossenzeiten (blaue Linie) und die approximierten Kurve (schwarze Linie).

Tab. 10: Geschwindigkeitskonstanten und Gleichgewichtskonstanten für das Modell von Nache und Mitarbeitern (2005).

Übergänge	$k_{\text{Hinreaktion}}$	$k_{\text{Rückreaktion}}$	$K_{\text{Gleichgewicht}}$
$C_0 \leftrightarrow C_1$	$5,37 \times 10^5 \pm 4,57 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$0,3867 \pm 0,0441 \text{ s}^{-1}$	$1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
$C_1 \leftrightarrow C_2$	$7,33 \times 10^6 \pm 3,24 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$2043,0 \pm 95,6 \text{ s}^{-1}$	$3,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
$C_2 \leftrightarrow C_3$	$7,44 \times 10^8 \pm 6,41 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1333,0 \pm 49,7 \text{ s}^{-1}$	$5,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
$C_0 \leftrightarrow O_0$	$0,260 \pm 0,015 \text{ s}^{-1}$	$1089,0 \pm 68,5 \text{ s}^{-1}$	$2,4 \times 10^{-4}$
$C_1 \leftrightarrow O_1$	$1,173 \pm 0,048 \text{ s}^{-1}$	$1392,0 \pm 47,5 \text{ s}^{-1}$	$8,4 \times 10^{-4}$
$C_2 \leftrightarrow O_2$	$422,1 \pm 26,5 \text{ s}^{-1}$	$224,4 \pm 9,3 \text{ s}^{-1}$	1,88
$C_3 \leftrightarrow O_3$	$1744,0 \pm 33,0 \text{ s}^{-1}$	$4,28 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$	407,1

Die ermittelten Werte für die Geschwindigkeitskonstanten zeigen, dass mit jedem bindenden Liganden die Reaktion zum Öffnen des Kanals schneller wird. Die Geschwindigkeitskonstante für die Hinreaktion aus einem geschlossenen in einen geöffneten Zustand vergrößert sich um das zehn- bis hundertfache. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Rückreaktion aus einem geöffneten in einen geschlossenen Zustand verhalten sich in umgekehrter Weise. Mit jedem gebundenen Liganden wird die Reaktion langsamer. Dies bedeutet, dass sich die Wahrscheinlichkeit einer Schließung verringert.

Abbildung 24B zeigt die Zeithistogramme der Offenereignisse (rote Linien) und die durch das Modell ermittelten Kurven (schwarze Linien). Die Offenzeiten können in allen verwendeten Konzentrationen annähernd gut beschrieben werden.

Abbildung 24C zeigt die Zeithistogramme der Geschlossenereignisse (blaue Linien) und die mit dem Modell ermittelten Kurven (schwarze Linien). Die Geschlossenzeiten können für alle Konzentrationen gut beschrieben werden.

Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten wurden mit den aus den makroskopischen Strömen bestimmten publizierten Geschwindigkeitskonstanten in der Arbeit von Nache und Mitarbeitern (2005) verglichen (Abb. 25). Lediglich die Daten für die sättigende cGMP-Konzentration und die Daten ohne Liganden stammen aus Einzelkanalmessungen. Die

Vergleiche der Geschwindigkeitskonstanten und Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Übergänge sind in Abbildung 25 gezeigt.

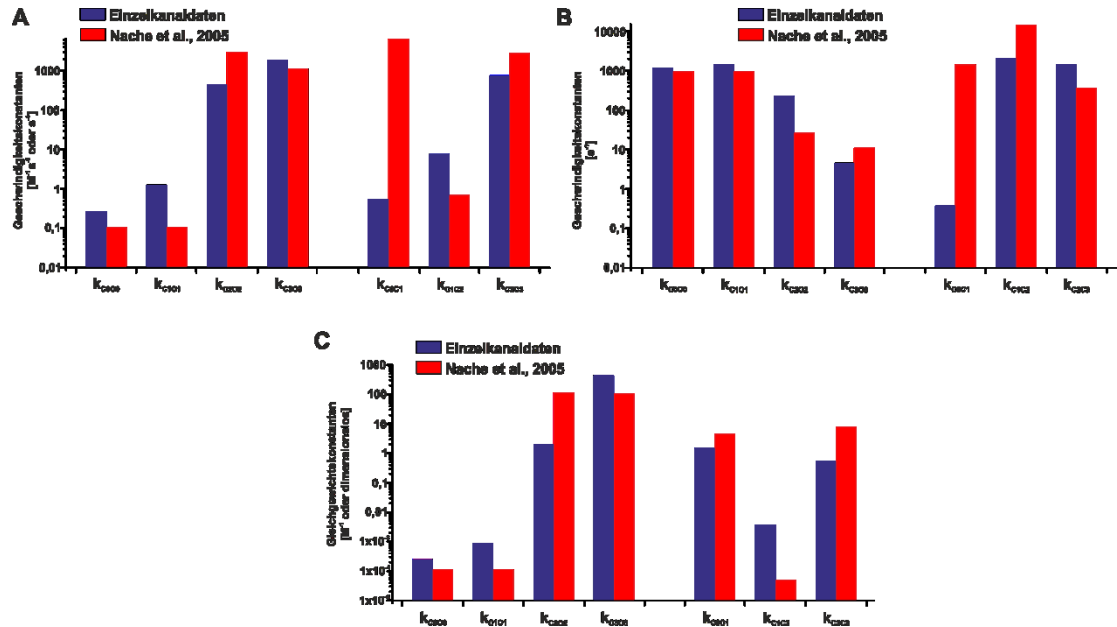


Abb. 25: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten und Gleichgewichtskonstanten aus dem Modell von Nache et al., 2005 mit den angepassten Geschwindigkeitskonstanten für die Einzelkanaldaten in dieser Arbeit. **A)** Hin-Reaktionen der Übergänge, **B)** Rück-Reaktionen der Übergänge, **C)** Gleichgewichtskonstanten der Übergänge im Vergleich

Der Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten zeigt einige deutliche Unterschiede, insbesondere für die Geschwindigkeitskonstante k_{C0C1} . Diese Konstante ist für die Originaldaten von Nache und Mitarbeitern (2005) um vier Größenordnungen schneller als die mittels der Einzelkanaldaten ermittelte Konstante. Der Vergleich der Gleichgewichtskonstanten für den Übergang zwischen den Zuständen $C_0 \leftrightarrow C_1$ (k_{C0C1}) zeigt jedoch keinen größeren Unterschied. Scheinbar ist für die untersuchten Bedingungen dieser Übergang wenig bestimmt, die Lage des Gleichgewichtes jedoch gut ausbalanciert. Die Gleichgewichtskonstanten für k_{C1C2} sind deutlich verschieden.

Das statistische Maß für die Güte der Modelle ist in der Qub-Software nicht das Chi-Quadrat sondern die *Log Likelihood*. Allgemein lässt sich sagen, je größer der Wert der *Log Likelihood*, umso besser ist das Modell bestimmt. Wird diese Größe auf die Anzahl der Parameter bezogen muss der Wert entsprechend kleiner sein, um als gut bestimmt angesehen

zu werden. Die Werte der *Log Likelihood* sowie die Anzahl der Parameter und die *Log Likelihood* pro Parameter sind in Tabelle 11 gezeigt.

Tab. 11: Güte der Modelle mit Hilfe der *Log Likelihood*.

	<i>LL</i>	<i>N</i> = Parameter	<i>LL/N</i>
Li & Lester Modell 1	64008,15	8	8001,02
Li & Lester Modell 2	60958,19	8	7619,77
Li & Lester erweitert	64829,34	10	6482,93
Nache Modell (C3L)	65268,9	14	4662,06

Wie man den Werten der Tabelle 11 entnehmen kann, ist das Modell von Nache und Mitarbeitern (C3L) mit einem *Log Likelihood* von 65268,9 und mit einem Wert von 4662,06 für die *Log Likelihood* pro Parameter das am besten bestimmte Modell der vier getesteten. Das Modell 3, aus beiden Li und Lester Modellen zusammengesetzt, zeigt bei der Betrachtung der Werte für die *Log Likelihood* und die *Log Likelihood* pro Parameter, dass durch den zusätzlichen Offenzustand die Daten bereits besser bestimmt werden konnten als die beiden Modelle nach Li und Lester dies einzeln konnten.

4.1.7 Aktivität des Kanals über den Verlauf der Zeit

Um langsamere Änderungen der Kanalaktivität zu erfassen als dies durch Offen- und Geschlossenzeiten ermittelt werden kann, wurde eine weitere Analyse durchgeführt. Dabei wurde für Zeitintervalle von 1,5 s der mittlere Strom bestimmt, der bei perfekt konstanter Amplitudenhöhe des Einzelkanalstromes proportional zur Offenwahrscheinlichkeit ist. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 26 gezeigt.

Der Kanal zeigt ein sich änderndes Aktivitätsmuster, welches klar länger dauernden Funktionszuständen entspricht, als dies mit Offen- und Geschlossenzeiten erfasst werden kann. Auch bei hohen Konzentrationen können sehr lange Geschlossenzeiten beobachtet werden (Abb. 26D). Solche langsameren Funktionszustände konnten mit Markov-Modellen

nicht erfasst werden. Dazu wären Messungen von größerer Dauer nötig, die jedoch technisch nicht machbar sind.

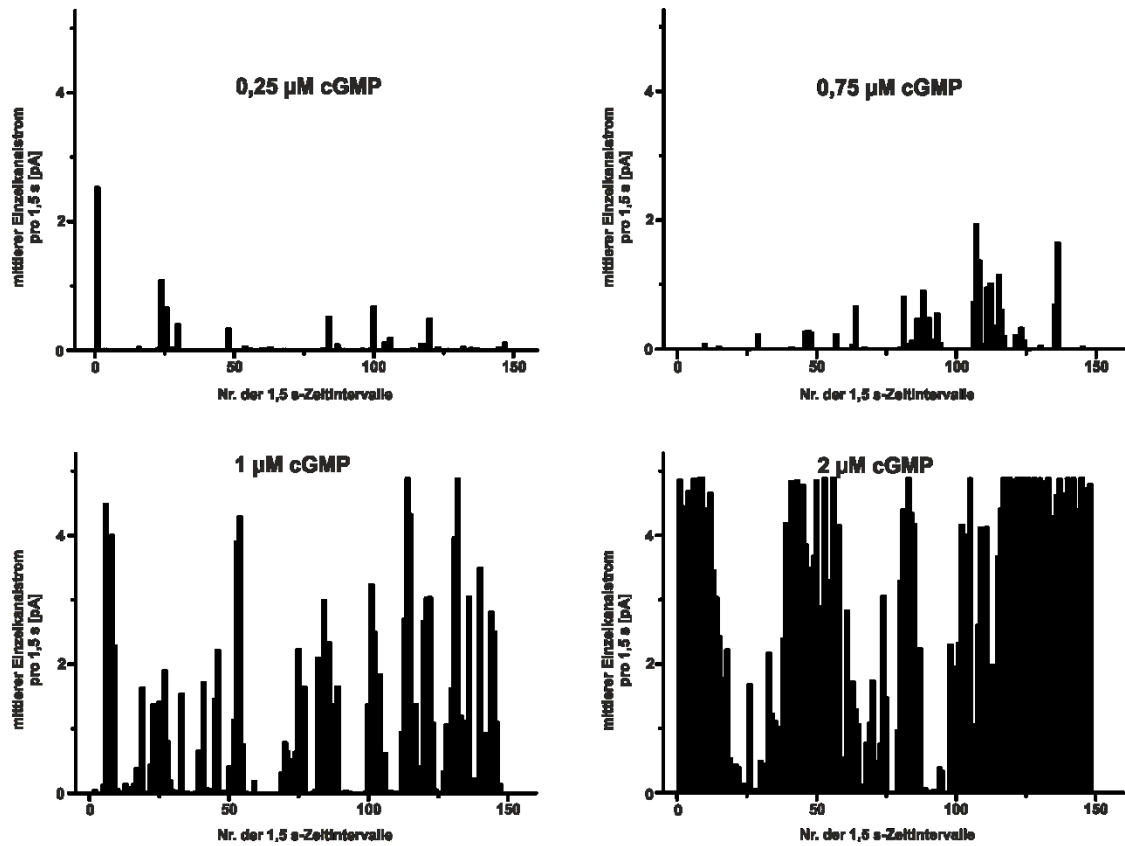


Abb. 26: Aktivität des homotetrameren CNGA2-Kanals über die Dauer eines definierten Zeitintervalls von 1,5 s bei vier nicht-sättigenden cGMP-Konzentrationen.

4.1.8 *Gating*-Modi des homotetrameren CNGA2-Kanals

Innerhalb des Messverlaufes konnten in ca. 2 % der gesamten Messzeit Intervalle erhöhten Rauschens im offenen Kanal beobachtet werden (Abb. 27). Die Messbedingungen wurden nicht geändert und auch die eingesetzte cGMP-Konzentration war konstant. Diese Aktivität wird mit drei verschiedenen *Gating*-Modi interpretiert.

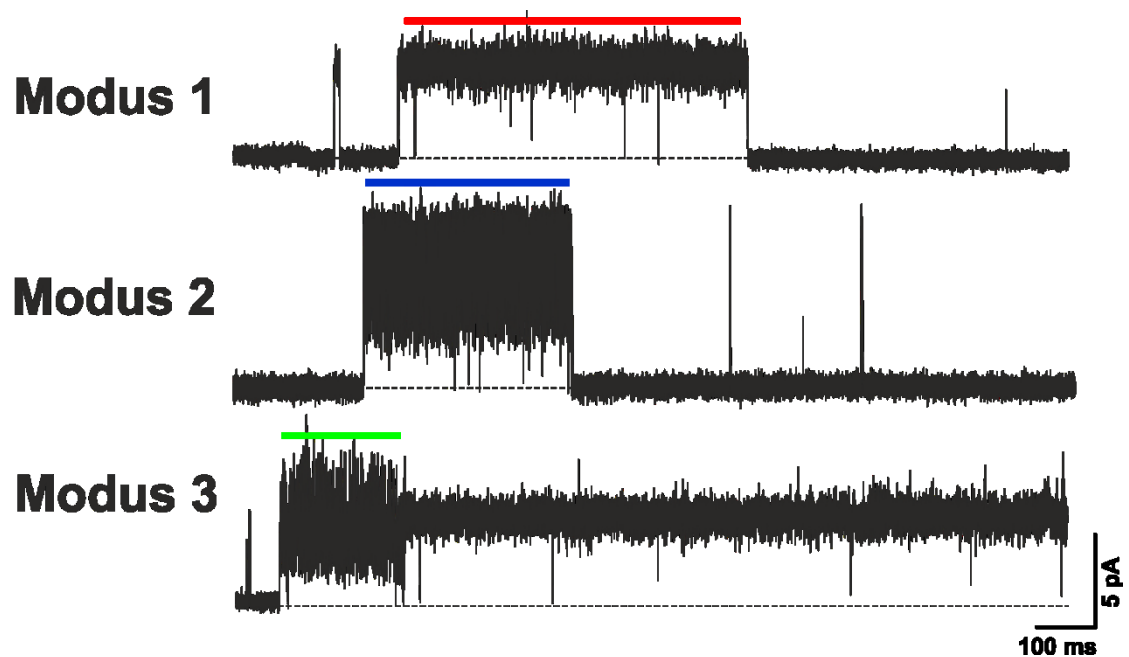


Abb. 27: Repräsentative Messungen mit drei verschiedene Rauschamplituden. *Gating Modus 1*) entspricht der Registrierung eines normalen Amplitudenniveaus, wie es in 98 % der Messungen vorkam. *Gating Modus 2*) zeigt ein spontan erhöhtes Rauschen im offenen Kanal mit Amplituden bis zu 12 pA. *Gating Modus 3*) zeigt eine erhöhte Rauschamplitude im offenen Kanal mit einer Amplitude bis zu 9 pA. Hier ist gut zu erkennen, dass der Kanal ohne längere Ruhepause in den normalen Modus (1) zurück fallen kann.

Bei genauerer Betrachtung des erhöhten Rauschens im Vergleich zur normalen Amplitude konnten Modi mit verschiedenen Niveaus innerhalb des Rauschens bestimmt werden. Um diese verschiedenen Rauschamplituden klar aufzutrennen, wurden Amplituden-Histogramme erstellt. Es konnte ein verbreitertes Rauschen mit einem Amplitudenbereich von 3 bis 12 pA sowie ein Rauschen mit einem Amplitudenbereich von 3,5 bis 9,0 pA klassifiziert werden (Abb. 28A). Der Amplitudenbereich des normalen Amplitudenniveaus konnte bei 5 bis 7 pA bestimmt werden (Abb. 28A). Die verschiedenen Rauschamplituden treten einzig im offenen Kanal auf. Man kann somit von verschiedenen *Gating*-Modi sprechen. Es lassen sich drei *Gating*-Modi definieren (Abb. 27).

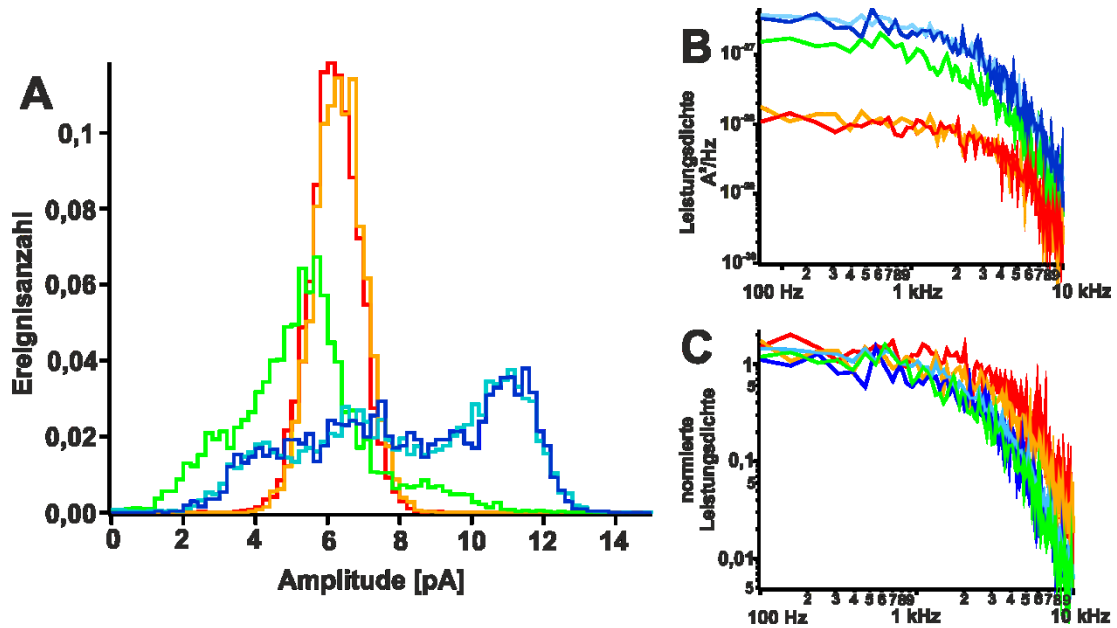


Abb. 28: Analyse des erhöhten Rauschens im offenen Kanal. Drei verschiedene Zustände (*Gating-Modi*) konnten identifiziert werden. Ein stärkeres Kanalrauschen im offenen Kanal trat nur in 2 % der Fälle auf. **A)** Beispiele für die drei *Gating-Modi* in Amplituden-Histogrammen. Rot und orange: normales Amplitudenniveau (*Gating-Modus* 1). Blau und hellblau: *Gating-Modus* 2. Grün: *Gating-Modus* 3. Es deuten sich mehrere kleine Niveaus an. **B)** Leistungsdichtespektren. Die Leistungsdichten für die *Gating-Modi* 2 (blau und hellblaue Linien) und 3 (grüne Linie) sind größer als für den *Gating-Modus* 1. **C)** Normierte Leistungsdichten. In den *Gating-Modi* 2 und 3 ist die Leistungsdichte kleiner als in *Gating-Modus* 1.

In den *Gating-Modi* 2 und 3 ist die normierte Leistungsdichte bei steigenden Frequenzen kleiner als in *Gating-Modus* 1 (Abb. 28).

4.2 Der heterotetramere CNG-Kanal

Der heterotetramere CNG-Kanal setzt sich aus den drei Untereinheiten CNGA2, CNGA4 und CNGB1b zusammen, die in einer Stöchiometrie von 2:1:1 (Bönigk *et al.*, 1999) vorliegen. Dieser CNG-Kanal entspricht in seinem Verhalten in den wesentlichen Aspekten dem nativen olfaktorischen CNG-Kanal (Zheng und Zagotta, 2004). Für die hier gezeigten Einzelkanalmessungen wurden die aus dem Genom der Ratte (*Rattus*) klonierten CNGA2-, A4- und B1b-Untereinheiten in der Stöchiometrie 2:1:1 in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Die Kanäle wurden in der *inside-out*-Konfiguration vermessen. Um sicher zu stellen, dass sich in

den untersuchten *Patches* nur ein einzelner Kanal befindet, wurde wie bei den homotetrameren CNGA2-Kanälen zu Beginn jeder Messung eine sättigende cGMP-Konzentration (100 μM) eingewaschen. Die Aktivierung des Kanals wurde dann bei vier nicht-sättigenden cGMP-Konzentrationen (0,25 μM , 0,75 μM , 1 μM , 2 μM) sowie eine Kontroll-Lösung (ohne Ligand) und der sättigenden Konzentration untersucht.

Die *Patches* wurden wiederum bei +100 mV vermessen. Abbildung 29 zeigt Beispielmessungen für alle getesteten Liganden-Konzentrationen. In Abbildung 30 sind Einzelkanalregistrierungen bei unterschiedlichen cGMP-Konzentrationen und einer *off-line* Filterung von 200 Hz gezeigt. Durch diese verstärkte Filterung können die unterschiedlichen Amplitudenniveaus des geöffneten Kanals besser beobachtet werden.

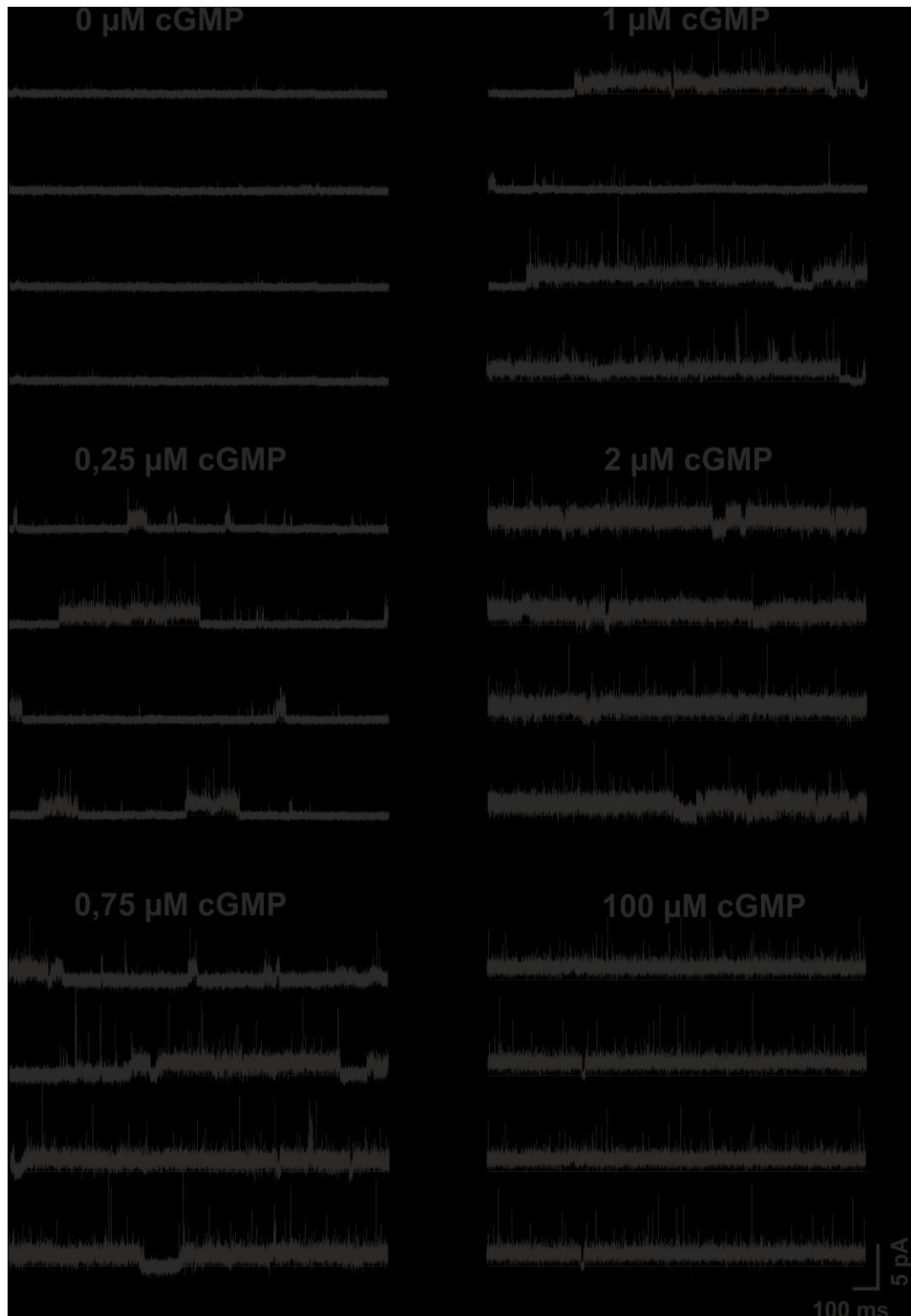


Abb. 29: Registrierung von Einzelkanalströmen des heterotetrameren CNG-Kanals (2xCNGA2:1xCNGA4:1xCNGB1b). Die Registrierung erfolgte bei unterschiedlichen cGMP-Konzentrationen (0, 0,25, 0,75, 1, 2, 100 μ M). Die Kontrolllösung (ohne Ligand) zeigt keine spontane Öffnung, die Offenwahrscheinlichkeit beträgt 0,0006 % (Ereignisse nicht gezeigt). Bei einer sättigenden cGMP-Konzentration von 100 μ M sind sehr kurze schnelle Schließungen zu beobachten

ansonsten ist der Kanal für das Hauptamplitudenniveau von ca. 1,3 pA zu 97,2 % geöffnet. Die Offenwahrscheinlichkeit steigt mit zunehmender Konzentration an cGMP, während die Amplitude des Hauptniveaus des Einzelkanalstromes konstant bleibt.

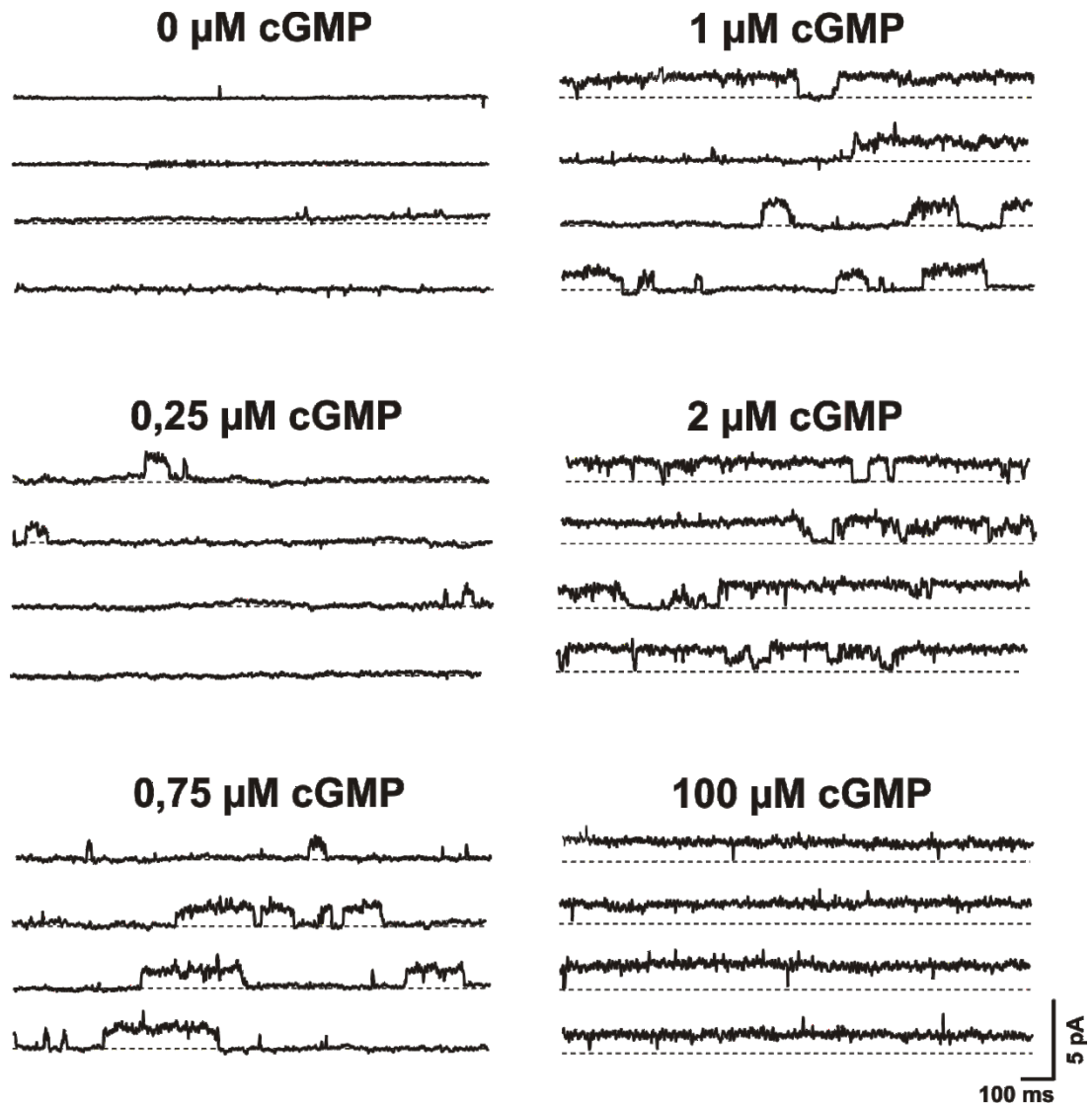


Abb. 30: Registrierung von Einzelkanalströmen des heterotetrameren CNG-Kanals (2xCNGA2:1xCNGA4:1xCNGB1b) mit einer *off-line* Filterung von 200 Hz. Durch die Filterung treten die unterschiedlichen Amplitudenniveaus des Hauptniveaus (1,3 pA) deutlicher hervor.

4.2.1 Einzelkanalstrom

Um den Einzelkanalstrom bei den verschiedenen Konzentrationen zu charakterisieren wurden Amplituden-Histogramme analysiert. Es wurden Zeitintervalle einer definierten Länge des beobachteten Kanals in geschlossenem und geöffnetem Zustand getrennt

analysiert (Abb. 31). Da der Einzelkanalstrom auf dem Niveau von 1,3 pA auch bei der sehr positiven Spannung von +100 mV sehr klein ist, können die Offen- und Geschlossenereignisse nur bei einer reduzierten Bandbreite analysiert werden.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 gezeigt. Die Amplitude des Einzelkanalstromes ist konzentrationsunabhängig. Sie beträgt $1,32 \pm 0,06$ pA. Unter der Annahme linearer Verhältnisse entspricht dies einer Leitfähigkeit von 13 pS. Mit steigender Ligandenkonzentration nimmt die Offenwahrscheinlichkeit zu.

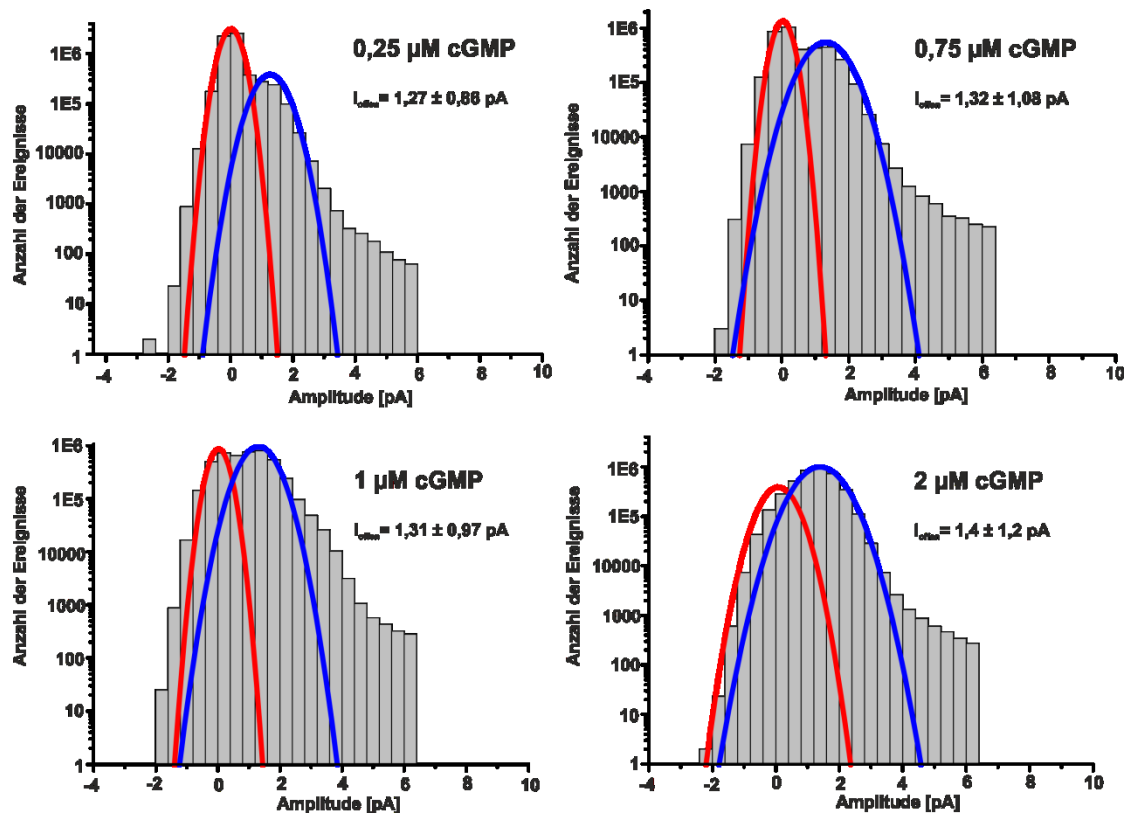


Abb. 31: Amplituden-Histogramme für den heterotetrameren CNG-Kanal bei zunehmenden cGMP-Konzentrationen. Die angepasste Kurve in rot zeigt die Gauß-Verteilung für die Ereignisse in der Grundlinie (für die Geschlossenereignisse) und die approximierte Kurve in blau die Gauß-Verteilung für die offenen Ereignisse. Aufgrund der breiten Streuung der Verteilungen überlappen die beiden Kurven sehr stark, weshalb die Analyse der Ereignisse separat erfolgte und anschließend zusammen in einem Histogramm aufgetragen wurde.

Der Einzelkanalstrom weist bei +100 mV ein dominierendes Niveau von 1,32 pA auf (Abb.31). Die bereits in der Literatur beschriebenen Einzelkanäle zeigen Ströme von ca. 2 pA (Bönigk *et al.*, 1999). Allerdings muss in diesem Fall berücksichtigt werden, dass die

Messungen bei +60 mV (cAMP) und mit Na⁺ als permeierendem Ion durchgeführt wurden. Die Leitfähigkeit des Kanals betrug ca. 34 pS. Dies zeigt, dass die Leitfähigkeit für Na⁺-Ionen größer ist als für K⁺-Ionen, ähnlich wie bei CNGA1-Kanälen (Kusch *et al.*, 2004).

Zusätzlich zum Niveau bei 1,3 pA zeigt der heterotetramere CNG-Kanal deutlich größere Öffnungen, die von dem Niveau bei 1,3 pA ausgehen. Diese Öffnungen sind nur sehr kurz und konnten deshalb keiner zeitlichen Analyse zugeführt werden. Sie imponieren in der Registrierung als „Nadeln“. Aufgrund der Komplexität der Öffnungen und der nicht aufgelösten Nadel-Öffnungen wurde keine Modell-Analyse der Kanalaktivität vorgenommen.

Tabelle 7 gibt die Werte der Offenwahrscheinlichkeiten (P_{open}) und die Stromamplituden für die unterschiedlichen Liganden-Konzentrationen an. Es ist ein deutlicher Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit zu beobachten während die Amplitude des Hauptamplitudenniveaus konstant bleibt.

Tab. 7: Werte für die Offenwahrscheinlichkeit und den Einzelkanalstrom bei unterschiedlichen cGMP-Konzentrationen.

cGMP [μM]	P_{open}	I_{open} [pA]
0	$0,0006 \pm 0,0006$	$0,00 \pm 0,02$
0,25	$0,07 \pm 0,03$	$1,27 \pm 0,86$
0,75	$0,37 \pm 0,06$	$1,32 \pm 1,08$
1	$0,70 \pm 0,05$	$1,31 \pm 0,97$
2	$0,9 \pm 0,0$	$1,4 \pm 1,2$
100	$0,97 \pm 0,02$	$1,31 \pm 1,06$

4.2.2 Konzentration-Wirkungs-Beziehung

In 4.2.1 wurde gezeigt, dass für das Heterotetramer die Offenwahrscheinlichkeit mit steigenden Liganden-Konzentrationen zunimmt und der Einzelkanalstrom konstant bleibt.

Daher kann die Offenwahrscheinlichkeit bei Einzelkanalmessungen einfach mit der normierten Stromamplitude bei makroskopischen Strömen verglichen werden.

Abbildung 32 zeigt die Abhängigkeit der Offenwahrscheinlichkeit der Einzelkanäle und des Stromes aus *Makropatches* (100 bis 1000 Kanäle) von der Liganden-Konzentration. Theoretisch sollten beide Beziehungen in gleicher Weise von der Liganden-Konzentration abhängig sein. Es wurde jedoch beobachtet, dass die Konzentration-Wirkungs-Kurve für Einzelkanalströme steiler ansteigt.

Zur Quantifizierung wurden die Werte für die halbmaximale Aktivierung (EC_{50}) und des Hill-Koeffizienten (H) mit Hilfe der Gleichung 1 (siehe Material und Methoden 3.5.1.1) bestimmt. Die EC_{50} -Werte unterscheiden sich nur unwesentlich, für makroskopische Ströme beträgt der Wert $0,7 \mu\text{M}$ und für Einzelkanalströme $0,8 \mu\text{M}$. Es liegt kein signifikanter Unterschied vor. Der Wert für den Hill-Koeffizienten (H) dagegen vergrößert sich von 2,01 in makroskopischen Strömen auf 3,3 in den Einzelkanalmessungen. Dennoch unterscheiden sich die Werte nicht signifikant. Der Hill-Koeffizient beschreibt die Anstiegsteilheit der Kurve der Konzentration-Wirkung-Beziehung.

Es wurde bereits in der Literatur für den homotetrameren CNGA1-Kanal beschrieben, dass die Konzentration-Wirkungs-Kurve für makroskopische Ströme flacher verläuft als die für Einzelkanalströme (Ruiz *et al.*, 1999). Dieser Befund konnte ebenfalls für den heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanal bestätigt werden.

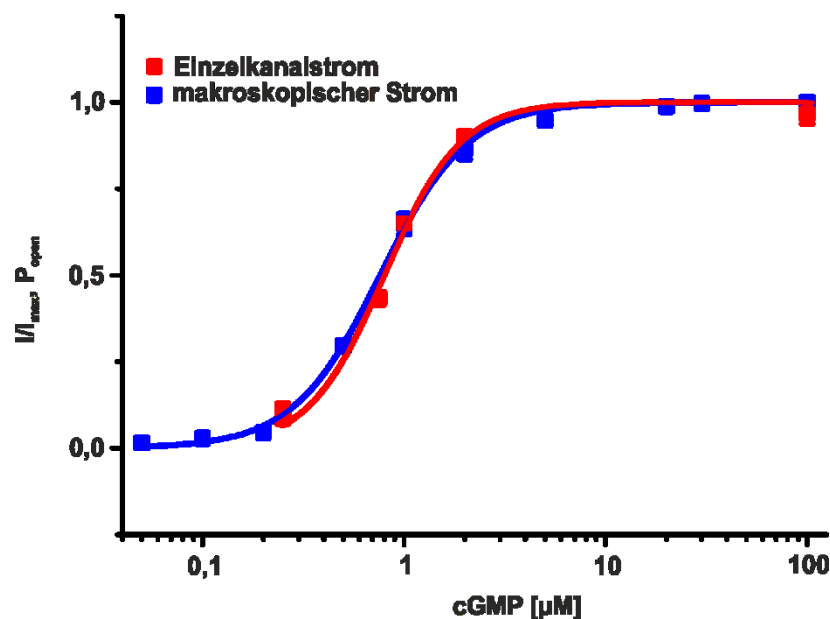


Abb. 32: Konzentration-Wirkungs-Beziehung für den heterotetrameren CNG-Kanal. Rot: Offenwahrscheinlichkeit aus Einzelkanalmessungen, blau: normalisierte Ströme aus *Makropatches*.

Linien: Approximation mittels der Hill-Gleichung (Gleichung 1). Die aus der angepassten Kurve ermittelten EC_{50} -Werte betragen $0,7 \mu\text{M}$ cGMP für den makroskopischen Strom sowie $0,8 \mu\text{M}$ cGMP für den Einzelkanalstrom. Die Werte für den Hill-Koeffizienten liegen bei 2,01 für den makroskopischen Strom und 3,3 für den Einzelkanalstrom.

Abbildung 33 zeigt eine große Streuung der Einzelmessungen auf. Einzelkanäle zeigen stark schwankende Offenwahrscheinlichkeiten. Diese Streuung zwischen den Kanälen geht in die Konzentration-Wirkungs-Kurve für Einzelkanalmessungen nicht ein. Aus diesem Grund sollte der ermittelte Wert für den Hill-Koeffizienten aus Einzelkanalmessungen der eigentlich richtige sein. Allerdings gibt die erhebliche Streuung der Hill-Koeffizienten Anlass zu Zweifeln.

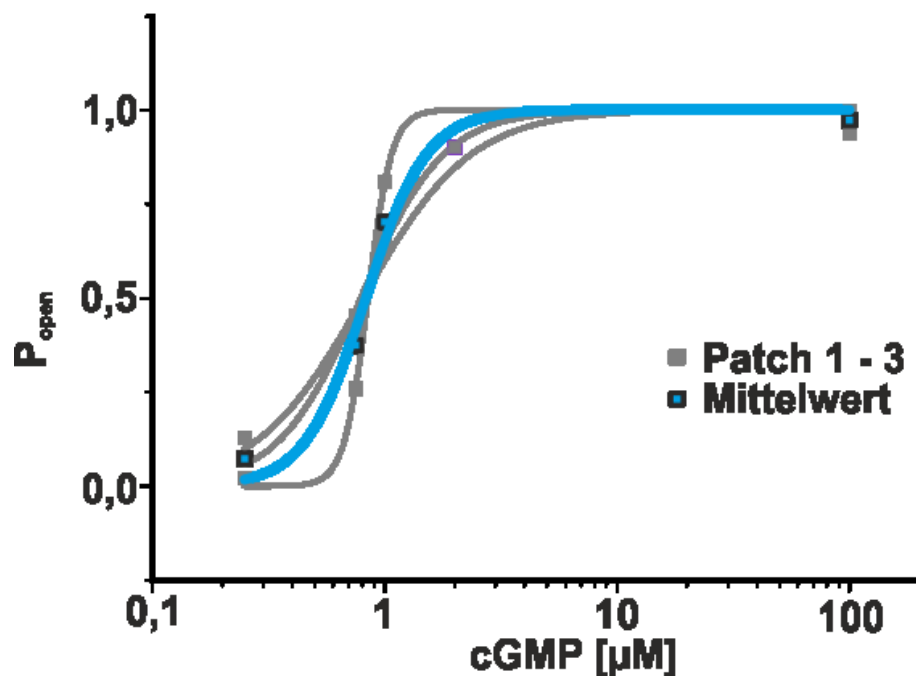


Abb. 33: Konzentration-Wirkungs-Beziehung für die Einzelkanalströme des heterotetrameren CNG-Kanals. Blau: Mittelwert aus Einzelkanalmessungen, grau: Einzelmessungen. Linie: approximierte Kurve aus der Hill-Gleichung (Gleichung 1) bestimmt. Die aus der angepassten Kurve ermittelten Werte sind in Tabelle 8 gezeigt.

Tab. 8: Werte für EC_{50} und Hill-Koeffizient, aus Einzelmessungen ermittelt.

	EC_{50}	Hill
Mittelwert	0,83 μ M cGMP	3,34
Patch 1	0,79 μ M cGMP	2,45
Patch 2	0,81 μ M cGMP	1,88
Patch 3	0,85 μ M cGMP	8,65

4.2.3 Offenzeiten

Mittels der unter 3.5.2.3 beschriebenen Methode wurden die Offenzeiten des 1,3 pA-Niveaus der heterotetrameren Kanäle bei vier nicht-sättigenden und der sättigenden cGMP-Konzentration (100 μ M) bestimmt.

Die Offenzeiten des Heterotetramers stellen sich als komplexere Verteilungen dar. Eine Approximation mit drei Zeitkonstanten konnte die Daten gut beschreiben (Abb. 34). Mit steigenden cGMP-Konzentrationen verteilen sich die Häufigkeiten der drei Zeitkonstanten ähnlich.

Die ermittelten Zeitkonstanten für die vier nicht-sättigenden und die sättigende cGMP-Konzentration sind in Tab. 9 aufgezählt.

Tab. 9: Zeitkonstanten für die Offenzeiten des heterotetrameren CNG-Kanals.

cGMP [μ M]	τ_1 [ms]	τ_2 [ms]	τ_3 [ms]
0,25	$1,26 \pm 0,12$	$7,93 \pm 0,44$	$57,95 \pm 0,35$
0,75	$0,84 \pm 0,05$	$4,72 \pm 0,07$	$65,96 \pm 0,04$
1	$2,32 \pm 0,12$	$16,78 \pm 0,47$	$83,49 \pm 0,17$
2	$1,99 \pm 0,12$	$13,34 \pm 0,51$	$106,20 \pm 0,15$
100	$1,28 \pm 0,05$	$12,39 \pm 0,07$	$179,41 \pm 0,04$

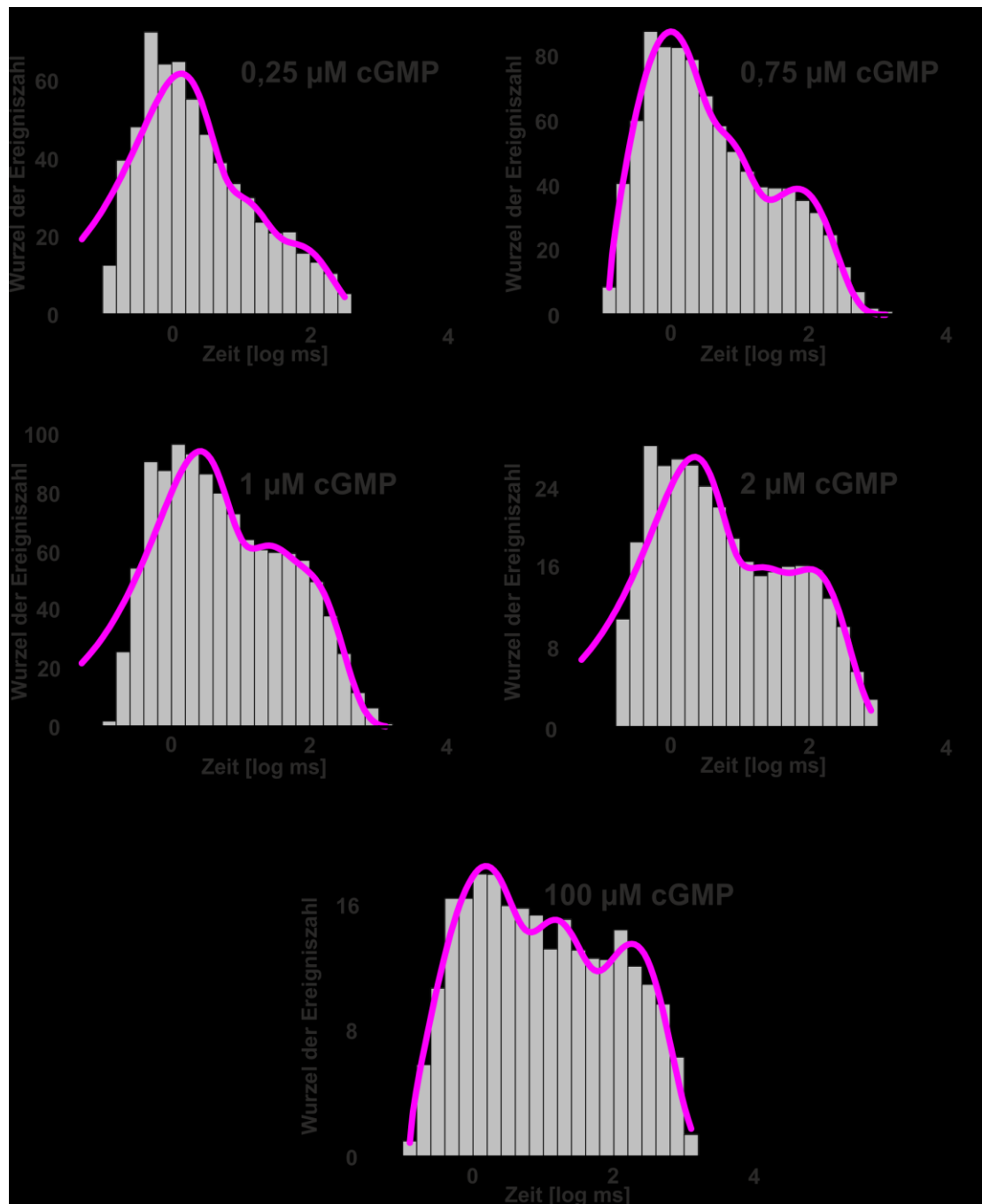


Abb. 34: Offenzeit-Histogramme für steigende cGMP-Konzentrationen. Die Offenzeiten stellen sich als komplexe Verteilung dar, die zumeist mit einer Approximation mit 3 Zeitkonstanten gut beschrieben werden konnten. Die Histogramme sind nach steigender cGMP-Konzentration angeordnet.

In Abbildung 35 sind die Zeitkonstanten und ihre Anteile in Abhängigkeit von der cGMP-Konzentration dargestellt. Mit steigender cGMP-Konzentration wird die dritte Zeitkonstante etwas langsamer. Die beiden schnelleren Zeitkonstanten bleiben nahezu gleich. Je größer die

cGMP-Konzentration, umso stärker verschiebt sich der Anteil zu längeren Offenzeiten, die dominierende Zeitkonstante ist jedoch noch immer die schnellste (in rot dargestellt).

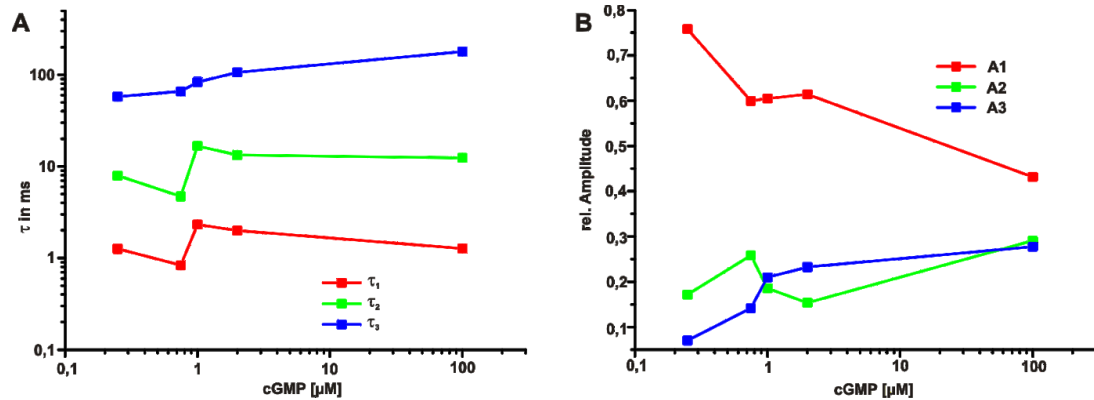


Abb. 35: Die Abhängigkeit der Zeitkonstanten und ihre relativen Anteile von der cGMP-Konzentrationen. Die Zeitkonstanten sind in **A)** dargestellt, die dritte (langsamste) Zeitkonstante nimmt mit steigender cGMP-Konzentration zu, die beiden ersten bleiben nahezu gleich schnell, die relativen Anteile dieser Zeitkonstanten sind in **B)** dargestellt.

4.2.4 Geschlossenzeiten

Die Geschlossenzeiten ergeben ebenfalls eine komplexe Verteilung. Eine Approximation mit drei Zeitkonstanten konnte die Daten gut beschrieben (Abb. 36). Mit steigender cGMP-Konzentration werden die Zeitkonstanten schneller.

Die ermittelten Zeitkonstanten für die Geschlossenzeiten des heterotetrameren CNG-Kanals sind in Tabelle 10 gezeigt.

Mit Näherung der cGMP-Konzentration an die Sättigung (100 μ M cGMP) verschiebt sich die Mehrzahl der Ereignisse zur kürzesten Zeitkonstante.

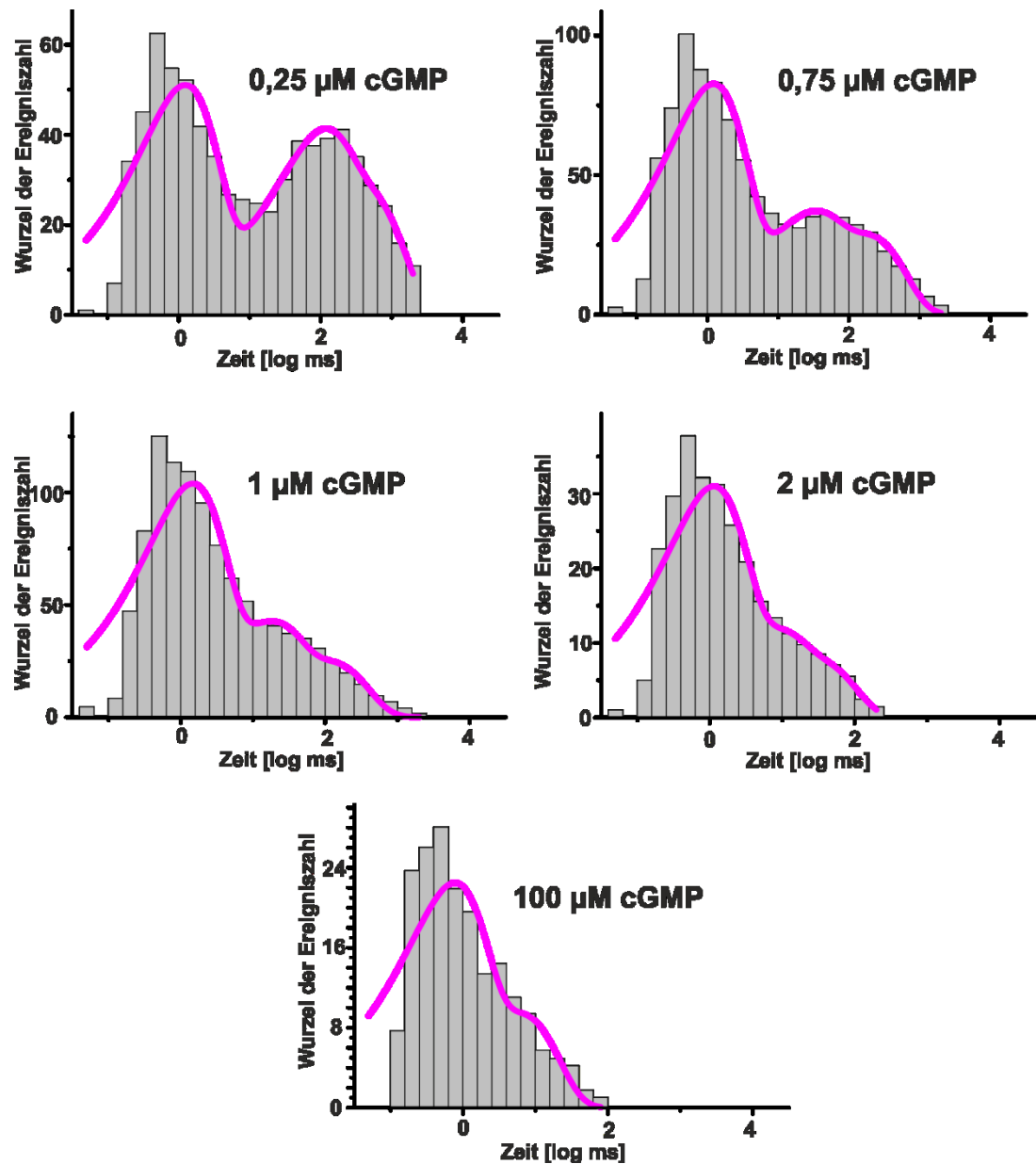


Abb. 36: Geschlossenzeit-Histogramme für steigende cGMP-Konzentrationen. Die Geschlossenzeiten lassen sich mit drei Zeitkonstanten gut beschreiben.

Tab. 10: Zeitkonstanten für die Geschlossenzeiten des heterotetrameren CNG-Kanals.

cGMP [μM]	τ_1 [ms]	τ_2 [ms]	τ_3 [ms]
0,25	$1,22 \pm 0,08$	$96,27 \pm 0,25$	$418,51 \pm 0,26$
0,75	$1,19 \pm 0,08$	$27,15 \pm 0,39$	$177,24 \pm 0,27$
1	$1,42 \pm 0,09$	$16,47 \pm 0,40$	$109,24 \pm 0,41$
2	$1,09 \pm 0,14$	$6,91 \pm 1,07$	$28,82 \pm 0,68$
100	$0,74 \pm 0,15$	$5,96 \pm 0,33$	

In Abbildung 37 sind die Abhängigkeiten der Zeitkonstanten von der cGMP-Konzentration aufgetragen. Die Dauer der geschlossenen Ereignisse nimmt mit steigender cGMP-Konzentration ab, da die Häufigkeit der Schließungen sinkt und die einzelnen Schließungsereignisse kürzer werden.

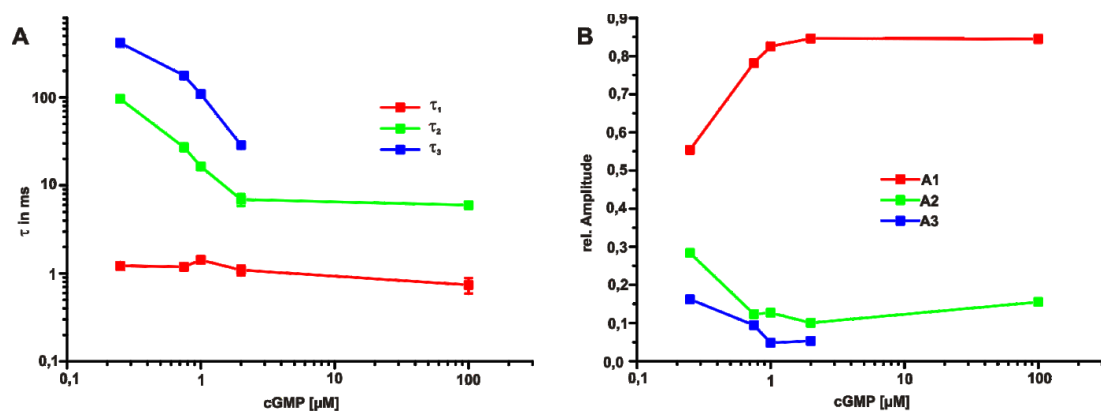


Abb. 37: Verteilung der Zeitkonstanten der Geschlossenzeiten und ihrer Anteile als Funktion der cGMP-Konzentrationen. Die Zeitkonstanten, in A) dargestellt, nehmen mit steigender cGMP-Konzentration ab. Die relativen Anteile sind in B) dargestellt.

4.2.5 Stromamplitude im heterotetrameren Einzelkanal

Der heterotetramere CNG-Kanal zeigt im offenen Zustand ein komplexes Schaltverhalten. Wie beschrieben sind neben dem Hauptamplitudenniveau von $1,32 \pm 0,06$ pA (+100 mV)

viele sehr kurze Ereignisse mit größerer Amplitude vertreten. Die Amplituden dieser Ereignisse schwanken zwischen 3 und 11 pA. Um zu testen, ob das Auftreten der sogenannten „Nadeln“ vom Ligandierungs-Zustand abhängt, wurden die „Nadeln“ getrennt vom Hauptamplitudenniveau analysiert und gegen die cGMP-Konzentration aufgetragen (Abb. 38).

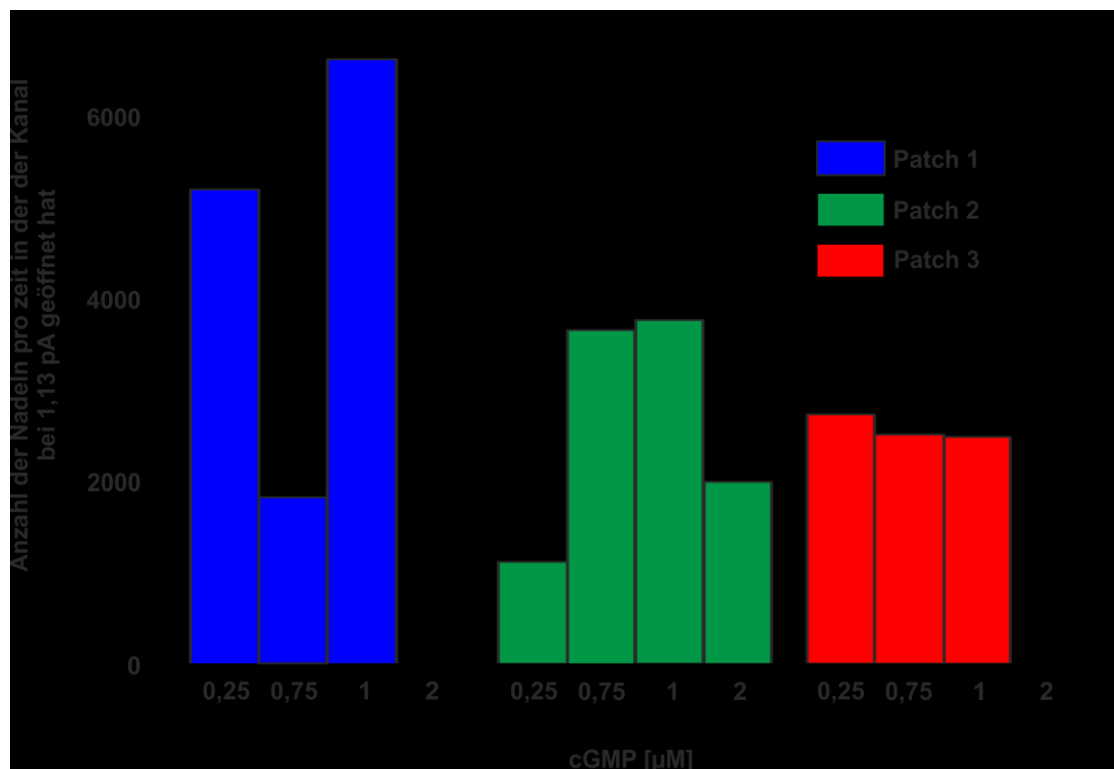


Abb. 38: Häufigkeit der vom Hauptamplitudenniveau abweichenden Ereignisse pro Offenzeit mit steigender cGMP-Konzentrationen.

Da mit steigenden cGMP-Konzentrationen die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals zunimmt, steigt auch die Häufigkeit der vom Hauptamplitudenniveau abweichenden Ereignisse mit einer größeren Amplitude. Bei Liganden-Konzentrationen über dem EC_{50} -Wert, ist das Verhältnis der Häufigkeit dieser Ereignisse nahezu identisch verteilt. Es konnte keine Abhängigkeit der Ereignishäufigkeit der „Nadeln“ von der Liganden-Konzentration beobachtet werden.

4.2.6 Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken des Einzelkanals

Einzelkanäle zeigen allgemein eine sofortige sprunghafte Öffnung zum charakteristischen Leitfähigkeitsniveau des Kanals. Der heterotetramere olfaktorische CNG-Kanal öffnet sich ebenfalls meistens mit einem solchen sprunghaften Vorgang. Es konnten jedoch zusätzlich auch langsamere Vorgänge beim Öffnen und Schließen des Kanals beobachtet werden (Abb. 39 und 40). Für die kinetische Analyse wurden die Zeitverläufe von je 100 schnellen Öffnungen und Schließungen sowie je 100 langsamer Öffnungen und Schließungen gemittelt und mit einem mono- oder biexponentiellen Modell bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 39 und 40 gezeigt.

Die schnellen Öffnungen und Schließungen konnten monoexponentiell beschrieben werden. Die Zeitkonstanten betrugen 0,54 ms (Abb. 39) und 1,37 ms (Abb. 40). Mit 0,54 ms sind diese Kinetiken bereits an der Grenze der technischen Auflösung, die sich aus der Verwendung eines Filters von 5 kHz und Unschärfen bei der zeitlichen Synchronisierung ergeben. Der wirkliche Schaltvorgang kann somit sehr viel schneller sein. Die Vorgänge der langsamen Aktivierung und Deaktivierung konnten ebenfalls monoexponentiell beschrieben werden. Die Zeitkonstante der langsamen Aktivierung beträgt 12,1 ms (Abb. 39). Die Zeitkonstante für die langsame Deaktivierung betrug $\tau = 18,45$ ms (Abb. 40).

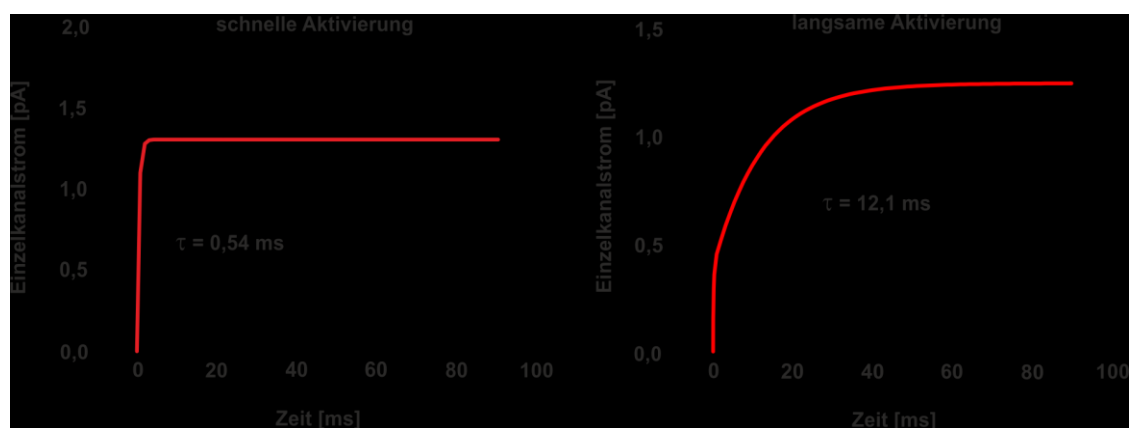


Abb. 39: Aktivierungskinetiken des heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanals. Jeweils 100 Ereignisse wurden synchronisiert und gemittelt. Die Zeitkonstanten konnten mittels eines monoexponentiellen Verlaufs ermittelt werden. Die rote Kurve zeigt den ermittelten exponentiellen Verlauf der Zeitkonstanten.

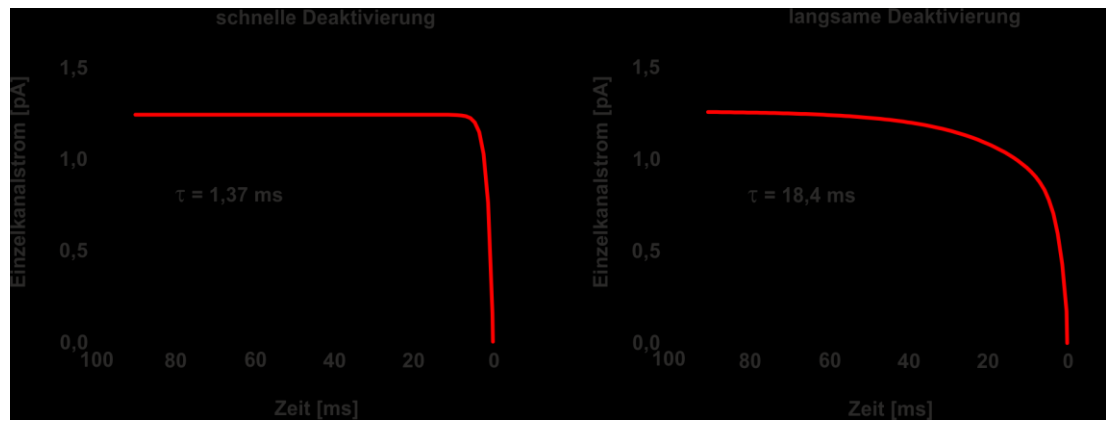


Abb. 40: Deaktivierungskinetik des heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanals. Es wurden jeweils 100 Verläufe synchronisiert und gemittelt. Die roten Kurven stellen Beschreibungen mit einem monoexponentiellen Modell dar.

Die langsame Öffnungs- und Schließungskinetik stellt ein sehr ungewöhnliches Schaltverhalten von Einzelkanälen dar. Möglicherweise wird dieses Verhalten durch eine der beiden β -Untereinheiten hervorgerufen.

5. Diskussion

Dank der Genauigkeit, die man durch Messungen von Einzelkanalströmen erhalten kann, ist man in der Lage, deutliche Aussagen über das Schalten von Ionenkanälen zu treffen. Die Einzelkanalanalyse stellt bis heute das mit Abstand beste Einzelmolekülverfahren überhaupt dar.

5.1 Der homotetramere CNG-Kanal (CNGA2)

Der olfaktorische homotetramere CNG-Kanal besitzt eine Leitfähigkeit von ca. 50 pS (Bönigk *et al.*, 1999; Li und Lester, 1999). Die Leitfähigkeit ändert sich auch über einen breiten Spannungsbereich nur wenig. Die Leitfähigkeit für cAMP und cGMP ist auch ähnlich, jedoch reagiert der Kanal auf cGMP sensibler (Li und Lester, 1999; Kaupp und Seifert, 2002). Da wir eine detaillierte Analyse des Einzelkanalstromes vornehmen wollten, wurde die Registrierung bei einer sehr großen Spannung von +100 mV durchgeführt. Damit konnten wir ein großes Signal/Rausch-Verhältnis erzielen.

5.1.1 Konzentration-Wirkungs-Beziehung

Der Vergleich der Konzentration-Wirkungs-Beziehungen aus makroskopischen Strömen und aus Einzelkanalmessungen erbrachte einen Unterschied des Hill-Koeffizienten (2,3 bei makroskopischen Strömen, 3,1 bei Einzelkanalströmen). Der Hill-Koeffizient entspricht dem Anstieg der Konzentration-Wirkungs-Kurve und ist ein Maß für die Kooperativität der Untereinheiten des Kanals. Dieser Unterschied könnte bedeuten, dass in Einzelkanälen drei Liganden nötig sind um den Kanal maximal zu öffnen und in makroskopischen Strömen lediglich zwei Liganden ausreichend sind. Ein ähnliches Phänomen ist in der Literatur (Ruiz *et al.*, 1999) bereits für den CNGA1-Kanal beschrieben worden. Es konnte hier bestätigt werden. Ursächlich könnte eine starke Mittelung der unterschiedlichen EC_{50} -Werte von Einzelkanalkurven in makroskopischen Patchen sein, was eine scheinbar flachere Kurve ergibt (Ruiz *et al.*, 1999). In diesem Fall wäre der Wert für den Hill-Koeffizienten aus makroskopischen Strömen nicht korrekt sondern der Wert von 3,1 aus Einzelkanälen, der allerdings einer großen Streuung unterliegt. Damit ergibt sich eine Zahl von drei Liganden-

Bindungen die nötig sind um den Kanal maximal zu öffnen. Dieses Ergebnis ist sehr wichtig für die Erstellung eines Modelles für den Kanal.

Eine andere Erklärung wäre, dass die Kanäle in makroskopischen *Patches* sehr nah beieinander liegen und somit kooperieren können. Damit wären tatsächlich weniger Liganden nötig um den Kanal maximal zu öffnen (Dekker und Yellen, 2006). Die Konzentration-Wirkungs-Kurve für Einzelkanäle setzt sich aus bedeutend weniger Messungen zusammen, weshalb die Streuung der Werte für die halbmaximale Aktivierung, die sich aus der Streuung zwischen den Kanälen ergibt, nicht so groß ist.

5.1.2 Offen- und Geschlossenzeiten

Da wir versuchen wollten ein Modell für den Kanal zu validieren, haben wir uns speziell auf die Auswertung der Einzelkanaldaten konzentriert und diese lediglich mit denen in der Literatur bestehenden Daten verglichen. Für die Analyse der Offen- und Geschlossenzeiten wurden Histogramme entsprechend gängiger Verfahren erstellt (Sigworth und Sine, 1987). Aus den Histogrammen konnten durch Approximation mittels eines mehr exponentiellen Verlaufs Zeitkonstanten ermittelt werden. Die angepassten Kurven mit drei Zeitkonstanten zeigten allgemein ein befriedigendes Ergebnis. Damit konnten mindestens drei offene und drei geschlossene Zustände für ein passendes Modell zur Beschreibung des Kanals angenommen werden. Der Kanal besitzt jedoch vier Bindestellen (Kaupp *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1998). Da der Kanal jedoch auch im unligandierten Zustand spontane Öffnungen zeigt (Picones und Korenbrot, 1995; Tibbs *et al.*, 1997; Zagotta und Siegelbaum, 1996; Ruiz und Karpen, 1997, 1999; Kleene, 2000), müsste man für ein Modell eigentlich zunächst fünf offene Zustände annehmen.

Die Verteilungen der Amplituden in den Offen- und Geschlossenzeit-Histogrammen geben einen Hinweis darauf, wie häufig bei verschiedenen cGMP-Konzentrationen die Ereignisse in den drei Komponenten vorkommen. Bei geringen Konzentrationen sind vorwiegend kurze Offenzeiten vertreten, die mit zunehmenden cGMP-Konzentrationen einen immer geringeren Anteil ausmachen. Mit steigenden Liganden-Konzentrationen nimmt die Häufigkeit mittellanger und langer Offenzeiten zu. Bei den intermediären cGMP-Konzentrationen sind die drei Komponenten der Offenzeiten gleichverteilt. Mit sättigenden cGMP-Konzentrationen sind vorwiegend lange Offenzeiten zu beobachten, während der Anteil an kurzen Offenzeiten sehr gering ist. Das gleiche Bild ergibt sich für die Geschlossenzeiten in umgekehrter Reihenfolge. So sind bei geringen cGMP-Konzentrationen zumeist lange Geschlossenzeiten zu beobachten und mit steigenden Liganden-Konzentrationen nimmt der

Anteil an langen Geschlossenzeiten ab, wohingegen der Anteil an kurzen Geschlossenzeiten zunimmt. Dies lässt einen Rückschluss auf das *Gating* bei verschiedenen Ligandierungszuständen zu. Bei geringen Konzentrationen kann man davon ausgehen, dass nur ein bis zwei Liganden gebunden haben. Da für diese Konzentrationen zumeist kurze Offenzeiten und lange Geschlossenzeiten beobachtet werden, kann man vermuten, dass die Übergänge für die Ligandierungszustände 0 und 1 in den geschlossenen Zustand sehr schnell verlaufen, bzw. der offene Zustand sehr instabil ist, da sehr lange Geschlossenzeiten beobachtet werden. Die nur sehr kurzen Offenzeiten machen über die gesamte Messzeit betrachtet einen geringen Anteil aus, da die Geschlossenzeiten durch ihre Länge dominierend sind. Deshalb kann vermutet werden, dass die Übergänge in den offenen Zustand sehr langsam verlaufen. Durch die langen Geschlossenzeiten kommt es nur selten zur Öffnung des Kanals und dann auch nur zu kurzen Offenzeiten. Der Prozess zum Öffnen des Kanals verläuft durch die langen Geschlossenzeiten äußerst langsam, weshalb die Geschwindigkeitskonstante für diesen Übergang sehr groß sein dürfte.

Bei der Betrachtung der Offen- und Geschlossenzeit-Histogramme für die sättigende Konzentration zeigt sich ein Bild wie für geringe Konzentrationen in umgekehrter Richtung. Die Geschlossenzeiten sind vorwiegend kurz, während die Offenzeiten zumeist sehr lang sind. Da man für sättigende Konzentrationen davon ausgehen kann, dass drei bis vier Bindestellen des Kanals mit Liganden besetzt sind, bedeutet das, dass die Offenzeiten mit mehr gebundenen Liganden länger werden, der Offenzustand somit sehr stabil ist. Das entspricht der Erwartung, da die sehr langen Offenzeiten auf die gesamte Messzeit bezogen nur sehr selten von kurzen Geschlossenzeiten unterbrochen werden. Daher kann man vermuten, dass der Prozess zur Schließung des Kanals in diesem Ligandierungszustand sehr selten abläuft und äußerst instabil ist. Somit wären die Übergangsgeschwindigkeiten für den dritten und vierten ligandierten Zustand in den Offenzustand sehr schnelle Geschwindigkeitskonstanten während die Übergänge in den geschlossenen Zustand sich als sehr langsame Geschwindigkeitskonstanten präsentieren würden.

Aufgrund der Erkenntnisse aus den Offen- und Geschlossenzeit-Histogrammen mit einer mathematischen Approximation mit je drei Zeitkonstanten und den bezüglich der Verteilung der Zeiten aufgestellten Hypothesen, kann man für die Erstellung eines Modelles von mindestens drei offenen und drei geschlossenen Zuständen ausgehen, plus zusätzlich einem offenen und einem geschlossenen Zustand für den unligandierten Kanal. Dies würde ein Modell mit vier geschlossenen und vier offenen Zuständen ergeben.

5.1.3 Reversibilität des Systems

Um weitere Kriterien für die Erstellung eines Modelles zu ermitteln, wurden die Daten auf Reversibilität untersucht. Durch den Vergleich der Offen- und Geschlossenzeit-Histogramme für die „Vorwärts“- und „Rückwärts“-Auswertungen kann ein System auf Reversibilität getestet werden (Song und Magleby, 1994). Makroskopische und mikroskopische Reversibilität beschreibt das Phänomen, dass in Markov-Modellen die kombinierten Geschwindigkeitskonstanten für alle Zyklusrichtungen identisch sind. Das Vorhandensein von Irreversibilität in einem Markov-Modell würde bedeuten, dass mindestens ein Übergang in einem geschlossenen Reaktionsweg nicht reversibel ist (Abb. 41). Dies würde einen Energieverbrauch bedingen, der physikalisch nicht umsetzbar ist.

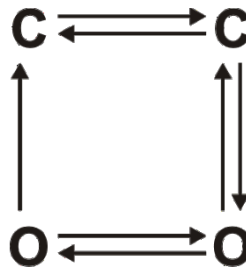


Abb. 41: Beispiel für mikroskopische Irreversibilität eines Markov-Modelles in einem zyklisch geschlossenen Reaktionsweg.

Für die Konzentrationen von 0,25 μM , 0,75 μM und 1 μM cGMP konnte deutlich eine Reversibilität nachgewiesen werden. Die Konzentration von 2 μM cGMP zeigt nur einen knapp signifikanten Unterschied im Vergleich der Offen- und Geschlossenzeit-Histogramme für beide Richtungen. Kein deutlich signifikanter Unterschied würde implizieren, dass entweder die Übergänge zwischen den verschiedenen Kanalzuständen nicht vollständig reversibel sind, oder dass zumindest die mikroskopische Reversibilität nicht gewährleistet ist. Für die Beschreibung der erfassten Einzelkanaldaten sind in den Modellen keine zyklischen Reaktionswege vorgesehen in denen mikroskopische Irreversibilität (wie in Abb. 41 gezeigt) auftreten könnte. Ein anderer Grund für Irreversibilität wäre, dass das Gesamtsystem kein stabiles Gleichgewicht aufweist. Das System kann jedoch ein stabiles Gleichgewicht einnehmen, da es bei nachfolgender Einwaschung anderer Konzentrationen ein normales Verhalten zeigt. Deshalb gehen wir davon aus, dass die leichte Irreversibilität von anderen Effekten wie Run-Down, Heterogenität zwischen den zur Auswertung erfassten Kanälen oder von Übergängen innerhalb der *Gating*-Modi zu erklären ist.

5.1.4 Modellierung des homotetrameren CNGA2-Kanals

Aufgrund der Ergebnisse nehmen wir für alle getesteten cGMP-Konzentrationen Reversibilität an. Dies würde für die Erstellung eines Modells zur Beschreibung des Kanals bedeuten, dass sich das Gesamtsystem im Gleichgewicht befindet und alle Übergänge voll reversibel sind.

Für die Erstellung eines geeigneten Modells zur Beschreibung der Einzelkanaldaten, wurden zunächst bestehende Modelle des Kanals auf ihre Richtigkeit überprüft. Mit Hilfe der Qub-Software (www.buffalo.edu (Milescu *et al.*, 2008)) konnten die Einzelkanaldaten global auf verschiedene Modelle angepasst werden. Die beiden einfachen CCOCO und CCCOO-Modelle, von Li und Lester (1999), beinhalteten nur je zwei ligandierte geschlossene und offene Zustände sowie einen unligandierten geschlossenen Zustand. Zu diesem Ergebnis ist man durch einen Hill-Koeffizienten von 2 und der Annahme von Kooperativität der Untereinheiten gelangt. Da die Ergebnisse der Offen- und Geschlossenzeit-Histogramme für die hier gezeigten Einzelkanaldaten bereits zu der Hypothese geführt haben, dass mindestens drei ligandierte offene und geschlossene Zustände für ein passendes Modell benötigt werden, ist das Ergebnis aus der globalen Analyse der Daten zu erwarten gewesen. Die ermittelten Kurven passen sich den gegebenen Histogramm-Verläufen nicht ausreichend gut an. Die dritte deutlich vorhandene Zeitkonstante in den Offenzeit-Histogrammen wurde bei diesen Modellen nicht berücksichtigt.

Durch die Kombination der beiden Modelle wurde ein weiterer Offenzustand eingefügt, wodurch das Modell den hypothetischen Vorstellungen eines geeigneten Modells näher war. Das Ergebnis zeigte bereits eine deutliche Annäherung zwischen den Offen- und Geschlossenzeit-Histogrammen und den approximierten Kurven. Die weiterhin bestehenden Unterschiede ließen vermuten, dass weitere Offen- und Geschlossenzustände in das Modell eingebracht werden müssen, damit dieses die Einzelkanaldaten hinreichend beschreiben kann.

Das komplexe 3CL-Modell (Nache *et al.*, 2005) erfüllt alle hypothetisch aufgestellten Bedingungen. Es besteht sowohl aus vier offenen als auch vier geschlossenen Zuständen, wobei drei Zustände jeweils Liganden gebunden haben und das gesamte System befindet sich im Gleichgewicht. Das Ergebnis der globalen Analysen auf der Basis des 3CL-Modelles, zeigt hohe Übereinstimmungen zwischen den Offen- und Geschlossenzeit-Histogrammen und den ermittelten Kurven. Die Daten der Einzelkanalmessungen können ausreichend gut mit dem 3CL-Modell von Nache und Mitarbeitern (2005) beschrieben werden. Die Möglichkeit, dass sich der Kanal im unligandierten Zustand öffnet, wurde genauso berücksichtigt, wie die Möglichkeit von mehr als drei Zuständen des geöffneten und

geschlossenen Kanals. Dass sich der Kanal auch im unligandierten Zustand öffnen kann, konnte mit einer Offenwahrscheinlichkeit von 0,04 % in einer Lösung ohne Liganden bestätigt werden. Zusätzlich befinden sich alle Übergänge im Gleichgewicht und spiegeln somit Reversibilität wieder. Ein vierter Ligand könnte an dieses Modell theoretisch noch angefügt werden, da nur drei Bindestellen besetzt sind. Diese Bedingung wurde in dem 4CL-Modell (Biskup *et al.*, 2007) beachtet und eingebaut. Die hier erhobenen Einzelkanaldaten sind jedoch nicht ausreichend, um dieses Modell global zu analysieren. Dazu wären noch weitere längere Messungen nötig. Für die Kontrolllösung und sättigende cGMP-Konzentration bedarf es noch mehr Datensätze, um eine globale Analyse für das 4CL-Modell (Biskup *et al.*, 2007) erstellen zu können. Die bisherigen Datensätze sind jedoch ausreichend, um das 3CL-Modell als ein geeignetes Modell für die Beschreibung der Einzelkanaldaten des CNGA2-Kanals zu identifizieren und damit zu validieren und dieses Modell ist schließlich im 4CL-Modell enthalten. Durch die *off-line* Filterung der Daten auf 1 kHz zur besseren Auswertung sind sehr kurze Offen- und Geschlossenzeiten verloren gegangen. Diese Tatsache könnte eine mögliche Erklärung für kleine Unterschiede zwischen den Offen- und Geschlossenzeit-Histogrammen und den durch globale Analysen angepassten Kurven sein. Die weiteren noch bestehenden Unterschiede lassen die Möglichkeit zu, dass mit noch ausführlicheren Datensätzen das 4CL-Modell (Biskup *et al.*, 2007) validiert werden kann.

Die Tatsache, dass das Modell von Nache *et al.* (2005) welches zum Großteil auf makroskopischen Messungen beruht, gut zu den hier gemessenen Einzelkanaldaten passt, zeigt jedoch dass die Ergebnisse aus makroskopischen Strömen auch für Einzelkanaldaten Gültigkeit besitzen. Die Unterschiede die man durch den Vergleich der Konzentration-Wirkungs-Beziehungen erhält, sind nicht signifikant, weshalb ein Vergleich der Datensätze aus makroskopischen Strömen und Einzelkanalmessungen in vielen Dingen direkt möglich ist. Die Ergebnisse, die man aus makroskopischen Messungen gewinnen kann, treffen ebenfalls auf Einzelkanäle zu.

5.1.5 Charakterisierung der *Gating*-Modi

Wie gezeigt werden konnte, weist der offene homotetramere CNGA2-Kanal in 2 % der Fälle eine erhöhte Rauschamplitude auf. Die Amplitude des Kanals bewegt sich innerhalb eines Bereiches von 3 bis 12 pA. In 98 % der Messzeit beträgt die Amplitude nur $5,5 \pm 0,29$ pA. Diese unterschiedlichen Amplituden sind sehr deutliche Veränderungen des Kanalverhaltens. Es konnten drei verschiedene *Gating*-Modi beschrieben werden. Der *Gating*-Modus 1

entspricht der normalen offenen Amplitude von $5,5 \pm 0,29$ pA. Der *Gating*-Modus 2 besitzt eine Amplitude zwischen 3 und 12 pA im offenen Kanal, während der *Gating*-Modus 3 eine Amplitude zwischen 3,5 und 9,0 pA aufweist. Dieses geänderte Verhalten tritt ohne die Änderung der Messbedingungen auf. Eine veränderte Amplitude des offenen Kanals bei gleich bleibenden Messbedingungen lässt auf eine veränderte Leitfähigkeit schließen, kann aber auch durch ein schnelles, nicht gewöhnliches *Gating* hervorgerufen werden. Root und MacKinnon (1994) haben bereits früher von solchen Schwankungen der Leitfähigkeit des Kanals berichtet. Die Messungen wurden jedoch bei negativen Spannungen (-80 mV) aufgezeichnet und in Verbindung mit einem Protonen-Block gebracht. Die Glutamatreste innerhalb der Porenregion bilden eine Bindestelle für zweiwertige Kationen (Root und MacKinnon, 1993; Eismann et al., 1994; Park und MacKinnon, 1995; Gavazzo *et al.*, 2000). Diese Bindestelle ist protonierbar (Tanaka *et al.*, 1993; Root und MacKinnon, 1994). Da die in dieser Arbeit verwendete Lösung jedoch keine zweiwertigen Kationen enthalten haben und der pH-Wert konstant bei 7,4 lag, könnten auch andere bisher noch nicht aufgeklärter Mechanismen als Ursache in Frage kommen.

5.2 Der heterotetramere olfaktorische CNG-Kanal

Die Auswertungsmethoden, die für den homotetrameren CNG-Kanal angewandt wurden, konnten nur bedingt für den heterotetrameren CNG-Kanal verwendet werden. Der heterotetramere olfaktorische CNG-Kanal zeigt ebenfalls einen Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit mit zunehmender cGMP-Konzentration. Der Einzelkanalstrom des Hauptniveaus ist mit 1,3 pA sehr klein und verkompliziert jede Analyse erheblich. Die Schnittfläche zwischen der Amplitudenverteilung des geschlossenen und des offenen Kanals war verhältnismäßig groß.

Zur weiteren Analyse mussten die Registrierungen idealisiert werden. Es wurde eine halbmaximale Schwelle gesetzt. Alles über dieser Schwelle wurde als ein offenes Ereignis und alles was sich unter dieser Schwelle befand, als geschlossenes Ereignis betrachtet. Zur Verfeinerung der Analyse wurde die halbmaximale Schwelle gespalten. Somit galten alle Ereignisse, die sich über der Schwelle befanden und alle Ereignisse, die sich in dem Bereich zwischen der gespaltenen Schwelle aber nicht unterhalb der unteren Schwelle lagen, zu den offenen Ereignissen und genauso umgekehrt. Aber auch bei dieser Analyse wurden sehr viele falsche Ereignisse für die weitere Auswertung registriert und gewertet. Deshalb muss die gesamte Auswertung der Daten des heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanals mit Vorsicht betrachtet werden.

Ein Unterschied des Hill-Koeffizienten bei makroskopischen Daten (2,01) und Einzelkanalmessungen (3,30) konnte auch für den heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanal beobachtet werden. Ein solcher Unterschied wurde bisher noch nicht für den heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanal in der Literatur beschrieben. Die Werte zeigten jedoch auch hier keinen signifikanten Unterschied. Bei der Betrachtung des Hill-Koeffizienten als Maß für die Anzahl der bindenden Liganden wären 3 Liganden nötig um den einzelnen Kanal maximal zu öffnen.

Es ist bekannt, dass die CNGA2-Untereinheit den Ligand cGMP binden kann (Finn *et al.*, 1996; Zagotta und Siegelbaum, 1996). Bei den Beta-Untereinheiten geht man davon aus, dass diese ebenfalls cGMP binden können (Shapiro und Zagotta, 2000; Young *et al.*, 2001), der letzte Beweis steht jedoch noch aus. Auf jeden Fall sind CNGA4 und CNGB1b regulatorische Untereinheiten des Kanals. Es wäre somit möglich, dass sie nur unterstützend wirken, indem sie die Bindung des Liganden an CNGA2 modulieren (Bradley *et al.*, 1994; Zimmermann, 1995; Shapiro und Zagotta, 2000; Young *et al.*, 2001; Waldeck *et al.*, 2009). Ein Vergleich der Konzentration-Wirkungs-Beziehungen zwischen dem heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanal und dem homotetrameren olfaktorischen CNGA2-Kanal zeigt, dass durch die β -Untereinheiten die Sensitivität des Kanals für cGMP verstärkt wird (Bradley *et al.*, 1994; Bönigk *et al.*, 1996; Sautter *et al.*, 1998). Der heterotetramere olfaktorische CNG-Kanal reagiert effektiver auf geringere Konzentrationen an cGMP (Young *et al.*, 2001; Kelliher *et al.*, 2003; Young und Krougliak, 2004; Waldeck *et al.*, 2009).

5.2.1 Offen- und Geschlossenzeiten

Die unter den gegebenen Bedingungen erhaltenen idealen Daten der Einzelkanalmessungen wurden zur Erstellung von Offen- und Geschlossenzeit-Histogrammen nach der Methode von Sigworth (Sigworth und Sine, 1987) verwendet. Auch hier konnte die Approximation mit drei Zeitkonstanten die Daten gut beschreiben. Das Ergebnis der Offenzeit-Histogramme zeigt, dass bei geringen cGMP-Konzentrationen die kurzen Offenzeiten am häufigsten auftreten, da deren Amplitude im Histogramm am stärksten dominiert. Mit steigenden cGMP-Konzentrationen nimmt der Anteil an kurzen Offenzeiten ab, während die mittellangen und langen Offenzeiten immer häufiger zu beobachten sind. Für eine sättigende cGMP-Konzentration (100 μ M) sind alle drei Zeitkonstanten ähnlich häufig verteilt. Trotzdem sind die kurzen Offenzeiten auch mit steigenden cGMP-Konzentrationen relativ oft zu beobachten. Ihr Vorkommen nimmt mit größeren cGMP-Konzentrationen nicht so

deutlich ab, wie es für den homotetrameren olfaktorischen CNGA2-Kanal beobachtet werden konnte. Möglicherweise gehen aufgrund des Signal/Rausch-Verhältnisses viele falsche Ereignisse in die Offenzeit-Histogramme ein. Allgemein werden alle drei Zeitkonstanten mit zunehmender cGMP-Konzentration etwas langsamer. Dies bedeutet, dass die Offenzeiten sich ein wenig verlängern. Bei der Betrachtung der Geschlossenzeit-Histogramme zeigt sich ein umgekehrtes Bild. Bereits bei geringen cGMP-Konzentrationen können viele kurze Geschlossenzeiten beobachtet werden. Aber auch viele lange Geschlossenzeiten sind vertreten. Mit zunehmender cGMP-Konzentration nimmt der Anteil der langen und mittellangen Geschlossenzeiten ab und die kurzen Geschlossenzeiten dominieren. Alle drei ermittelten Zeitkonstanten werden mit steigenden cGMP-Konzentrationen ein wenig schneller.

5.2.2 Modellierung des heterotetrameren CNG-Kanals

Betrachtet man die Offen- und Geschlossenzeit-Histogramme, müsste man für die Erstellung eines Modells mindestens drei offene und geschlossene Zustände voraussetzen, solange man davon ausgeht, dass die idealen Daten korrekt ermittelt sind. Da der Kanal im unligandierten Zustand eine Offenwahrscheinlichkeit von 0,06 % aufweist, wären bei drei geschlossenen Zuständen, die alle in einen offenen Zustand übergehen können, nur zwei Ligandenbindungen abgebildet. Die Verteilungen der Offen- und Geschlossenzeiten weisen aber darauf hin, dass es noch einen vierten oder sogar fünften Zustand geben könnte. In diesem Falle könnte ein potenzielles Modell dem 3CL-Modell (Nache *et al.*, 2005) oder sogar dem 4CL-Modell (Biskup *et al.*, 2007) ähneln. Auf die Erstellung eines Modells zur Beschreibung des Kanals wurde jedoch, aus Gründen einer limitierten Auswertung verzichtet. Im Moment ist nicht absehbar, wie man aus Einzelkanaldaten ausreichende Informationen für ein belastbares kinetisches Modell erhalten kann. Erfolgsversprechend scheinen erneute Ansätze mit makroskopischen Strömen zu sein, wie sie in Biskup *et al.* (2007) verfolgt wurden.

5.2.3 Charakterisierung der Nadeln des heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanals

Betrachtet man den heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanal, fällt auf, dass dieser regelmäßig im offenen Kanal Ereignisse mit Amplitudenspitzen bis 11 pA aufweist, die in

der Registrierung als Nadeln imponieren. Ähnlich hohe Amplitudenspitzen zeigt der homotetramere Kanal im *Gating*-Modus 2.

Der heterotetramere olfaktorische CNG-Kanal zeigt über dem Hauptamplitudenniveau verschieden hohe Amplitudenspitzen bis 11,0 pA. Würden diese Spitzen unmittelbar aufeinander folgen, würde sich das Bild des homotetrameren CNGA2-Kanals mit den *Gating*-Modi 2 und 3 zeigen. Dass dies nicht der Fall ist, könnte an der Beteiligung der verschiedenen Untereinheiten liegen. Möglicherweise wird das Verhalten mit Amplitudenspitzen bis 11 und 12 pA durch einen kurzzeitigen Prozess, der noch nicht geklärt ist, an der CNGA2-Untereinheit verursacht. Durch die doppelte Anzahl an CNGA2-Untereinheiten im homotetrameren Kanal tritt dieser Effekt dort verstärkt auf und äußert sich in einem starken Flickern der Amplitude in *Gating*-Modus 2 und 3. Durch die regulatorischen Untereinheiten des heterotetrameren Kanals könnte dieser Prozess kontrolliert werden. Weshalb es hier in regelmäßigen Abständen und ohne fließende Übergänge zu diesen Amplitudenspitzen kommt.

Die Konzentration des aktivierenden Liganden hat auf diesen Prozess keinen Einfluss. Weder für den homotetrameren noch für den heterotetrameren Kanal konnte eine Konzentrations-Abhängigkeit beobachtet werden. Für den heterotetrameren Kanal konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit dieser Amplitudenspitzen nicht mit steigenden Liganden-Konzentrationen zunimmt. Da diese Amplitudenspitzen nur im offenen Kanal auftreten, kann vermutet werden, dass eine Struktur innerhalb der Pore für dieses Verhalten zuständig ist. Um den Angriffspunkt dieses Verhaltens aufzuklären, könnten Mutationen an den potentiell wichtigen Porenpositionen untersucht werden, z.B. indem man die von Root und McKinnon (1994) erwähnten Glutamatreste (Glu³³³) der CNGA2-Untereinheit durch eine andere Aminosäure, z.B. Glycin, ersetzt und mit den β -Untereinheiten als heterotetrameren Kanal exprimiert. Da der heterotetramere Kanal dieses Verhalten in Regelmäßigkeit zeigt, sollten diese Amplitudenspitzen verschwinden, soweit die Glutamatreste der CNGA2-Untereinheit innerhalb der Pore dafür verantwortlich sind.

5.2.4 Aktivierungs- und Deaktivierungskinetiken

Der heterotetramere olfaktorische CNG-Kanal zeigt bei der Aktivierung und Deaktivierung teilweise langsame Verläufe. Die ermittelte Zeitkonstante ist mit $\tau = 12,14$ ms bedeutend langsamer als die ermittelte Zeitkonstante der normalen schnellen Aktivierungskinetik zur Öffnung des Kanals ($\tau = 0,54$ ms). Die langsame Deaktivierungskinetik zur Schließung des Kanals konnte ebenfalls monoexponentiell

bestimmt werden. Die Zeitkonstante ($\tau = 18,45$ ms) ist deutlich langsamer als die ermittelte Zeitkonstante für normale schnelle Deaktivierungskinetiken zur Schließung des Kanals ($\tau = 1,37$ ms).

Das Auftreten der langsam verlaufenden Aktivierungskinetik könnte ein Hinweis auf die Anzahl der gebundenen Liganden sein. Der Kanal zeigt unterschiedliche Leitfähigkeiten bei verschiedenen Spannungen (Bönigk *et al.*, 1999), und auch die Amplitudenspitzen deuten auf kurzzeitige unterschiedliche Leitfähigkeiten hin. Möglicherweise hat der Ligandierungszustand des Kanals einen Einfluss auf die Aktivität und die Leitfähigkeit des Kanals. Hat der Kanal nur einen Liganden gebunden, kann er sich öffnen, möglicherweise jedoch mit einer geringeren Leitfähigkeit, da die Amplitude des Hauptniveaus sehr gering ist, nur 1,3 pA. Wenn die Registrierung ein kleineres Signal/Rausch-Verhältnis aufweist, wäre der Effekt einer möglicherweise geringeren Leitfähigkeit durch die Öffnung des Kanals mit nur einem gebundenen Liganden nicht gut aufgelöst. Im Fall der langsamen Aktivierungskinetik hat möglicherweise eine der beiden β -Untereinheiten den ersten Liganden gebunden. Dadurch könnte die Affinität für den zweiten und dritten Liganden herabgesetzt sein, so dass die Leitfähigkeit langsam ansteigt und erst bei der vollständigen Bindung des zweiten und dritten Liganden das Hauptamplitudenniveau erreicht. Denkbar ist, dass die CNGA2-Untereinheit die höchste Affinität zu cGMP besitzt (Finn *et al.*, 1996; Zagotta und Siegelbaum, 1996), da die β -Untereinheiten möglicherweise nur regulatorische Komponenten des Kanals darstellen, wodurch die Bindung des Liganden im Heteromer nicht nötig wäre. In den meisten Fällen würde der erste Ligand somit an die CNGA2-Untereinheit binden was die Affinität zum zweiten Liganden steigern würde und die Aktivierung würde normal schnell verlaufen. Dennoch sei erneut angemerkt, dass das Wissen über diese Beteiligung der verschiedenen Untereinheiten an Bindung und Aktivierung nur sehr unvollständig ist.

Bei der Deaktivierung wäre möglicherweise die Reihenfolge der Dissoziation entscheidend für das Bild der Deaktivierungskinetik. Wenn der letzte gebundene Ligand an eine der beiden CNGA2-Untereinheiten gebunden hat, zeigt sich eine normale schnelle Deaktivierung, sobald dieser dissoziiert und der Kanal geschlossen wird. Sollte der letzte gebundene Ligand jedoch an einer der beiden β -Untereinheiten gebunden sein, verläuft die Abspaltung langsamer, wodurch die Deaktivierung mit einer langsamen Zeitkonstante abläuft. Um diese Theorie zu prüfen müsste man mit Mutationen des Kanals arbeiten, in denen nur die β -Untereinheiten in der Lage sind cGMP zu binden, oder mit Mutationen, in denen die Affinität der CNGA2-Untereinheit zu cGMP sehr verringert ist, um zu erreichen, dass der erste Ligand an einer der Beta-Untereinheiten gebunden wird. Sollte die Aktivierung und Deaktivierung des Einzelkanals die gleichen langsamen Kinetiken zeigen,

hätte man einen Nachweis für diese Hypothese erbracht. Allerdings kann gegenwärtig auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die Reihenfolge der Abspaltung nicht gleich der umgekehrten Reihenfolge der Bindungen ist.

6. Schlussfolgerung

Schlussfolgernd lässt sich sagen,

- dass beruhend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, ein Modell des homotetrameren olfaktorischen CNGA2-Kanals mindestens drei offenen und geschlossenen Zustände enthalten muss um die Daten ausreichend beschreiben zu können. Bei der Überprüfung der bestehenden Modelle für den homotetrameren olfaktorischen CNGA2-Kanal konnte das 3CL-Modell (Nache *et al.*, 2005) die Daten gut beschreiben. Da jedoch noch kleine Ungenauigkeiten auftraten, kann vermutet werden, dass eine Erweiterung dieses Modelles wie für das 4CL-Modell (Biskup *et al.*, 2007) bestehend, die Daten gültiger beschreiben würden. Allerdings konnte dieses Modell nicht überprüft werden, da eine Fülle an Daten dazu nötig wäre, die das technisch mögliche übertrifft.
- dass der homotetramere olfaktorische CNGA2-Kanal in 2 % der Messzeit ein geändertes Kanalverhalten im offenen Zustand zeigt. Die drei beschriebenen Gating-Modi lassen entweder auf eine geänderte Leitfähigkeit schließen oder basieren auf einem schnellen nicht gewöhnlichen Gating. Es gibt verschiedenen mögliche Interpretationen für dieses Verhalten. Da der heterotetramere olfaktorische CNG-Kanal ebenfalls erhöhte Amplitudenspitzen bis zu 11 pA aufzeigt, die als Nadeln imponieren, wäre eine mögliche Erklärung in besonderen Eigenschaften der CNGA2-Untereinheit zu finden. Durch das Zusammenspiel der verschiedenen Untereinheiten im Heterotetramer tritt dieses Verhalten regelmäßig auf. Durch das Fehlen der β -Untereinheiten im homotetrameren Kanal kann dieser Prozess nicht regelmäßig beobachtet werden, tritt jedoch nach auftreten erst nach einiger Zeit in den Normalzustand wieder über.
- dass die Analyse des heterotetrameren olfaktorischen CNG-Kanals durch einen sehr kleinen Einzelkanalstrom mit einem Hauptniveau von 1,3 pA und einen geringen Signal/Rausch-Verhältnisses erschwert wurde. Aufgrund der limitierten Analyse und der daraus mit Vorsicht zu betrachtenden Ergebnisse wurde von der Beschreibung der Daten durch ein Modell abgesehen. Erfolgsversprechend scheinen Ansätze mit makroskopischen Strömen, wie sie in Biskup *et al.* (2007) genutzt wurden, zur Erstellung eines gültigen Modelles zu sein.
- dass der heterotetramere olfaktorische CNG-Kanal im offenen Zustand durch unterschiedliche Amplitudenspitzen ein sehr ungewöhnliches Verhalten zeigt. Besonders der Vergleich zwischen den Nadeln mit Amplituden bis zu 11 pA des heterotetrameren

Kanals mit dem Gating-Modi 2 und 3 des homotetrameren CNGA2-Kanals geben viel Raum für weiterführende Experimente zur genauen Aufklärung des Verhaltens.

- dass der heterotetramere olfaktorische CNG-Kanal ein unterschiedliches Schaltverhalten durch unterschiedliche Aktivierungs- und Deaktivierungs-kinetiken zeigt. Es konnten sowohl normal schnelle Kinetiken beobachtet werden, wie auch bedeutend langsamere Kinetiken. Ursächlich kann die Bindung des Liganden an α - und β -Untereinheiten sein. Die Bindung an einen β -Untereinheit als ersten Bindungsschritt würde in diesem Fall den Prozess des Gatings verlangsamen ebenso umgekehrt. Sollte der letzte gebundene Ligand ebenfalls an einer β -Untereinheit gebunden sein, könnte das den Prozess der Deaktivierung verlangsamen.

7. Zusammenfassung

CNG-Kanäle sind ligandengesteuerte nichtselektive Kationenkanäle, die durch die direkte Bindung zyklischer Nukleotide (z.B. cAMP, cGMP) aktiviert werden. Es sind tetramere Proteine deren vier Untereinheiten sich um eine zentrale Pore anordnen. Jede Untereinheit besteht aus 6 transmembranalen Segmenten, besitzt eine Porenregion, die an der Bildung der Kanalpore beteiligt ist und trägt eine C-terminale CN-Bindestelle. Es sind verschiedene Typen von Untereinheiten bekannt. Die α - und die β -Untereinheiten. Lediglich die α -Untereinheiten sind in der Lage auch alleine, funktionelle Kanäle zu bilden. In der Natur liegen CNG-Kanäle zumeist als heterotetramere Proteine vor. CNG-Kanäle sind weit verbreitet, sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten, wo sie in sensorischen und nichtsensorischen Zellen vorkommen.

Der vorliegenden Arbeit liegen elektrophysiologische Messungen des klonierten homotetrameren CNGA2-Kanals des olfaktorischen Sensorneurons des Rindes, sowie des klonierten heterotetrameren CNGA2:A4:B1b-Kanals des olfaktorischen Sensorneurons der Ratte zugrunde. Die Kanäle wurden in einem heterologen System (*Xenopus laevis*) exprimiert.

Ziel dieser Arbeit war es, ein gültiges Modell zur Beschreibung der beiden Kanäle zu bestimmen. Für den homotetrameren CNGA2-Kanal sind bereits einige Modelle in der Literatur beschrieben wurden (Li und Lester, 1999; Nache *et al.*, 2005; Biskup *et al.*, 2007). Über den heterotetrameren CNG-Kanal ist bisher nur sehr wenig in der Literatur bekannt. Es wurden sowohl makroskopische als auch Einzelkanaleigenschaften untersucht, um ein gültiges Modell für die verwendeten CNG-Kanäle zu erstellen. Bei der Auswertung der Messdaten konnten eine Reihe neuer und bereits bekannter Eigenschaften des Kanals identifiziert werden. Die ermittelten Amplituden-Histogramme geben Aufschluss über eine stabile Leitfähigkeit des Kanals bei steigenden Liganden-Konzentrationen und verdeutlichen durch die Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit ihre Bedeutung als Ursache für den Anstieg der Dosis-Wirkungs-Kurve bei steigenden cGMP-Konzentrationen. Mittels Offen- und Geschlossenzeit-Histogrammen wurden Zeitkonstanten bestimmt, mit deren Hilfe eine Aussage über die Anzahl an offenen und geschlossenen Zuständen eines gültigen Modelles getroffen werden konnten. Die Überprüfung der bereits bestehenden Modelle für den homotetrameren CNGA2-Kanal zeigte dann auch, dass zwei offene Zustände nicht ausreichend genug sind um den Kanal adäquat zu beschreiben. Das aus der Literatur bekannte 3CL-Modell (Nache *et al.*, 2005) beruhte auf makroskopischen Strömen, konnte aber die Einzelkanaldaten ebenfalls gut beschreiben. Ein *Log Likelihood* von ca. 65.000

zeigte, dass das Modell am geeignetsten von allen getesteten Modellen zur Beschreibung des Kanals ist.

Das komplexe Schaltverhalten der registrierten Einzelkanalströme des heterotetrameren CNG-Kanals erschwerten eine umfassende Auswertung. Durch eine geringe Amplitudenhöhe des geöffneten Kanals und ein geringes Signal/Rausch-Verhältnis wurden bei der Idealisierung der Daten vermehrt falsche Öffnungs- und Schließungsereignisse gewertet. Dadurch sind besonders die kurzen Offen- und Geschlossenzeiten fehlerbehaftet. Durch eine separate Analyse der offenen und geschlossenen Kanalampplitude konnte die Stabilität der Leitfähigkeit des Kanals bei steigender Liganden-Konzentration nachgewiesen werden und die zunehmende Offenwahrscheinlichkeit als Ursache für den Anstieg der Dosis-Wirkungs-Kurve identifiziert werden. Die weitere Analyse des Kanalverhaltens erfolgte rein deskriptiv, weshalb von der Erstellung eines Modells für den heterotetrameren CNG-Kanal abgesehen wurde.

Beide untersuchten CNG-Kanäle zeigten Auffälligkeiten in ihrem Kanalverhalten. Der homotetramere CNGA2-Kanal zeigte in 2 % der gesamt registrierten Messzeit ein deutlich erhöhtes offenes Kanalrauschen. Es ließen sich drei verschiedene *Gating*-Modi mit unterschiedlichen offenen Kanalampplituden bestimmen. Diese erhöhten Rauschamplituden traten ohne eine Änderung der Messbedingungen auf und deuten auf eine geänderte Leitfähigkeit des Kanals hin.

Der heterotetramere CNG-Kanal zeigte neben der geringen offenen Kanalampplitude zusätzlich Ein-, Zwei- und Mehr-Punkt Ereignisse von deutlich größerer Amplitude bei geöffnetem Kanal, die als Nadeln imponierten. Sie traten mit relativ großer Regelmäßigkeit auf, nahmen jedoch nicht durch steigende Liganden-Konzentration an Häufigkeit zu. Dieses sehr heterogene Verhalten der offenen Kanalampplitude des heterotetrameren CNG-Kanals ist wahrscheinlich durch die Zusammensetzung der unterschiedlichen Untereinheiten bedingt.

Der homotetramere CNGA2-Kanal wurde hinreichend gut mit dem 3CL-Modell beschrieben, wodurch gezeigt werden konnte, dass Ergebnisse aus makroskopischen Strömen auch auf Einzelkanäle anwendbar sind. Der heterotetramere CNG-Kanal lässt nur eine deskriptive Beschreibung zu.

8. Literaturverzeichnis

Ahmad, I., C. Korbmayer, A. S. Segal, P. Cheung, E. L. Boulpaep und C. J. Barnstable (1992). "Mouse cortical collecting duct cells show nonselective cation channel activity and express a gene related to the cGMP-gated rod photoreceptor channel." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(21): 10262-10266.

Altenhofen, W., J. Ludwig, E. Eismann, W. Kraus, W. Bonigk und U. B. Kaupp (1991). "Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(21): 9868-9872.

Biel, M., W. Altenhofen, R. Hullin, J. Ludwig, M. Freichel, V. Flockerzi, N. Dascal, U. B. Kaupp und F. Hofmann (1993). "Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-gated channel from rabbit aorta." *FEBS letters* **329**(1-2): 134-138.

Biel, M., X. Zong, M. Distler, E. Bosse, N. Klugbauer, M. Murakami, V. Flockerzi und F. Hofmann (1994). "Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(9): 3505-3509.

Biskup, C., J. Kusch, E. Schulz, V. Nache, F. Schwede, F. Lehmann, V. Hagen und K. Benndorf (2007). "Relating ligand binding to activation gating in CNGA2 channels." *Nature* **446**(7134): 440-443.

Bonigk, W., W. Altenhofen, F. Muller, A. Dose, M. Illing, R. S. Molday und U. B. Kaupp (1993). "Rod and cone photoreceptor cells express distinct genes for cGMP-gated channels." *Neuron* **10**(5): 865-877.

Bonigk, W., J. Bradley, F. Muller, F. Sesti, I. Boekhoff, G. V. Ronnett, U. B. Kaupp und S. Frings (1999). "The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**(13): 5332-5347.

Bonigk, W., F. Muller, R. Middendorff, I. Weyand und U. B. Kaupp (1996). "Two alternatively spliced forms of the cGMP-gated channel alpha-subunit from cone

photoreceptor are expressed in the chick pineal organ." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**(23): 7458-7468.

Borisy, F. F., G. V. Ronnett, A. M. Cunningham, D. Juilfs, J. Beavo und S. H. Snyder (1992). "Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**(3): 915-923.

Bradley, J., W. Bonigk, K. W. Yau und S. Frings (2004). "Calmodulin permanently associates with rat olfactory CNG channels under native conditions." *Nature neuroscience* **7**(7): 705-710.

Bradley, J., S. Frings, K. W. Yau und R. Reed (2001). "Nomenclature for ion channel subunits." *Science* **294**(5549): 2095-2096.

Bradley, J., J. Li, N. Davidson, H. A. Lester und K. Zinn (1994). "Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: a subunit that confers increased sensitivity to cAMP." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(19): 8890-8894.

Bradley, J., J. Reiser und S. Frings (2005). "Regulation of cyclic nucleotide-gated channels." *Current opinion in neurobiology* **15**(3): 343-349.

Chen, T. Y., M. Illing, L. L. Molday, Y. T. Hsu, K. W. Yau und R. S. Molday (1994). "Subunit 2 (or beta) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca(2+)-calmodulin modulation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(24): 11757-11761.

Chen, T. Y., Y. W. Peng, R. S. Dhallan, B. Ahamed, R. R. Reed und K. W. Yau (1993). "A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods." *Nature* **362**(6422): 764-767.

Chen, T. Y. und K. W. Yau (1994). "Direct modulation by Ca(2+)-calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons." *Nature* **368**(6471): 545-548.

Cook, N. J., W. Hanke und U. B. Kaupp (1987). "Identification, purification, and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**(2): 585-589.

- Corey, D., Stevens, C.F (1983) Science and technology of patch-recording electrodes. In: B. Sakmann, Neher, E (Eds.), *Single-Channel Recording*, Plenum Press, New York, pp. 53-68.
- Craven, K. B. und W. N. Zagotta (2006). "CNG and HCN channels: two peas, one pod." *Annual review of physiology* **68**: 375-401.
- Dekker, J. P. und G. Yellen (2006). "Cooperative gating between single HCN pacemaker channels." *The Journal of general physiology* **128**(5): 561-567.
- Dhallan, R. S., K. W. Yau, K. A. Schrader und R. R. Reed (1990). "Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons." *Nature* **347**(6289): 184-187.
- DiFrancesco, D. und P. Tortora (1991). "Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP." *Nature* **351**(6322): 145-147.
- Distler, M., M. Biel, V. Flockerzi und F. Hofmann (1994). "Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells." *Neuropharmacology* **33**(11): 1275-1282.
- Dumont, J. N. (1972). "Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals." *Journal of morphology* **136**(2): 153-179.
- Dzeja, C., V. Hagen, U. B. Kaupp und S. Frings (1999). "Ca²⁺ permeation in cyclic nucleotide-gated channels." *The EMBO journal* **18**(1): 131-144.
- Eismann, E., F. Muller, S. H. Heinemann und U. B. Kaupp (1994). "A single negative charge within the pore region of a cGMP-gated channel controls rectification, Ca²⁺ blockage, and ionic selectivity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(3): 1109-1113.
- Fesenko, E. E., S. S. Kolesnikov und A. L. Lyubarsky (1985). "Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment." *Nature* **313**(6000): 310-313.
- Finn, J. T., M. E. Grunwald und K. W. Yau (1996). "Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions." *Annual review of physiology* **58**: 395-426.

- Finn, J. T., D. Krautwurst, J. E. Schroeder, T. Y. Chen, R. R. Reed und K. W. Yau (1998). "Functional co-assembly among subunits of cyclic-nucleotide-activated, nonselective cation channels, and across species from nematode to human." *Biophysical journal* **74**(3): 1333-1345.
- Frings, S. (2001). "Chemoelectrical signal transduction in olfactory sensory neurons of air-breathing vertebrates." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **58**(4): 510-519.
- Frings, S., J. W. Lynch und B. Lindemann (1992). "Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. Activation, selectivity, and blockage." *The Journal of general physiology* **100**(1): 45-67.
- Frings, S., R. Seifert, M. Godde und U. B. Kaupp (1995). "Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels." *Neuron* **15**(1): 169-179.
- Gavazzo, P., C. Picco, E. Eismann, U. B. Kaupp und A. Menini (2000). "A point mutation in the pore region alters gating, Ca(2+) blockage, and permeation of olfactory cyclic nucleotide-gated channels." *The Journal of general physiology* **116**(3): 311-326.
- Gerstner, A., X. Zong, F. Hofmann und M. Biel (2000). "Molecular cloning and functional characterization of a new modulatory cyclic nucleotide-gated channel subunit from mouse retina." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**(4): 1324-1332.
- Goldin, A.L., Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol*, 1992. 207: 266-79.
- Gordon, S. E., J. Downing-Park und A. L. Zimmerman (1995). "Modulation of the cGMP-gated ion channel in frog rods by calmodulin and an endogenous inhibitory factor." *The Journal of physiology* **486** (Pt 3): 533-546.
- Gordon, S. E., J. C. Oakley, M. D. Varnum und W. N. Zagotta (1996). "Altered ligand specificity by protonation in the ligand binding domain of cyclic nucleotide-gated channels." *Biochemistry* **35**(13): 3994-4001.

- Gordon, S. E. und W. N. Zagotta (1995). "A histidine residue associated with the gate of the cyclic nucleotide-activated channels in rod photoreceptors." *Neuron* **14**(1): 177-183.
- Gordon, S. E. und W. N. Zagotta (1995). "Localization of regions affecting an allosteric transition in cyclic nucleotide-activated channels." *Neuron* **14**(4): 857-864.
- Goulding, E. H., J. Ngai, R. H. Kramer, S. Colicos, R. Axel, S. A. Siegelbaum und A. Chess (1992). "Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from catfish olfactory neurons." *Neuron* **8**(1): 45-58.
- Goulding, E. H., G. R. Tibbs, D. Liu und S. A. Siegelbaum (1993). "Role of H5 domain in determining pore diameter and ion permeation through cyclic nucleotide-gated channels." *Nature* **364**(6432): 61-64.
- Goulding, E. H., G. R. Tibbs und S. A. Siegelbaum (1994). "Molecular mechanism of cyclic-nucleotide-gated channel activation." *Nature* **372**(6504): 369-374.
- Haynes, L. W. (1995). "Permeation and block by internal and external divalent cations of the catfish cone photoreceptor cGMP-gated channel." *The Journal of general physiology* **106**(3): 507-523.
- Haynes, L. W., A. R. Kay und K. W. Yau (1986). "Single cyclic GMP-activated channel activity in excised patches of rod outer segment membrane." *Nature* **321**(6065): 66-70.
- Heginbotham, L., T. Abramson und R. MacKinnon (1992). "A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels." *Science* **258**(5085): 1152-1155.
- Henn, D. K., A. Baumann und U. B. Kaupp (1995). "Probing the transmembrane topology of cyclic nucleotide-gated ion channels with a gene fusion approach." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(16): 7425-7429.
- Hsu, Y. T. und R. S. Molday (1993). "Modulation of the cGMP-gated channel of rod photoreceptor cells by calmodulin." *Nature* **361**(6407): 76-79.
- Hsu, Y. T. und R. S. Molday (1994). "Interaction of calmodulin with the cyclic GMP-gated channel of rod photoreceptor cells. Modulation of activity, affinity purification, and localization." *The Journal of biological chemistry* **269**(47): 29765-29770.

- Ildefonse, M. und N. Bennett (1991). "Single-channel study of the cGMP-dependent conductance of retinal rods from incorporation of native vesicles into planar lipid bilayers." *The Journal of membrane biology* **123**(2): 133-147.
- Jan, L. Y. und Y. N. Jan (1990). "A superfamily of ion channels." *Nature* **345**(6277): 672.
- Kandasamy, S. B. und B. A. Williams (1983). "Central effects of dibutyryl cyclic AMP and GMP on the temperature in conscious rabbits." *Brain research* **277**(2): 311-320.
- Karpen, J. W., R. L. Brown, L. Stryer und D. A. Baylor (1993). "Interactions between divalent cations and the gating machinery of cyclic GMP-activated channels in salamander retinal rods." *The Journal of general physiology* **101**(1): 1-25.
- Kaupp, U. B., T. Niidome, T. Tanabe, S. Terada, W. Bonigk, W. Stuhmer, N. J. Cook, K. Kangawa, H. Matsuo, T. Hirose und et al. (1989). "Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel." *Nature* **342**(6251): 762-766.
- Kaupp, U. B. und R. Seifert (2002). "Cyclic nucleotide-gated ion channels." *Physiological reviews* **82**(3): 769-824.
- Kelliher, K. R., J. Ziesmann, S. D. Munger, R. R. Reed und F. Zufall (2003). "Importance of the CNGA4 channel gene for odor discrimination and adaptation in behaving mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(7): 4299-4304.
- Kleene, S. J. (1993). "Origin of the chloride current in olfactory transduction." *Neuron* **11**(1): 123-132.
- Kleene, S. J. (2000). "Spontaneous gating of olfactory cyclic-nucleotide-gated channels." *The Journal of membrane biology* **178**(1): 49-54.
- Koch, K. W. und U. B. Kaupp (1985). "Cyclic GMP directly regulates a cation conductance in membranes of bovine rods by a cooperative mechanism." *The Journal of biological chemistry* **260**(11): 6788-6800.

- Kolesnikov, S. S., A. B. Zhainazarov und A. V. Kosolapov (1990). "Cyclic nucleotide-activated channels in the frog olfactory receptor plasma membrane." *FEBS letters* **266**(1-2): 96-98.
- Korschen, H. G., M. Illing, R. Seifert, F. Sesti, A. Williams, S. Gotzes, C. Colville, F. Muller, A. Dose, M. Godde und et al. (1995). "A 240 kDa protein represents the complete beta subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor." *Neuron* **15**(3): 627-636.
- Kramer, R. H. und S. A. Siegelbaum (1992). "Intracellular Ca²⁺ regulates the sensitivity of cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor neurons." *Neuron* **9**(5): 897-906.
- Kurahashi, T. (1989). "Activation by odorants of cation-selective conductance in the olfactory receptor cell isolated from the newt." *The Journal of physiology* **419**: 177-192.
- Kurahashi, T. und A. Kaneko (1993). "Gating properties of the cAMP-gated channel in toad olfactory receptor cells." *The Journal of physiology* **466**: 287-302.
- Kurahashi, T. und A. Menini (1997). "Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell." *Nature* **385**(6618): 725-729.
- Kurahashi, T. und T. Shibuya (1990). "Ca²⁺(+)-dependent adaptive properties in the solitary olfactory receptor cell of the newt." *Brain research* **515**(1-2): 261-268.
- Kurahashi, T. und K. W. Yau (1993). "Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells." *Nature* **363**(6424): 71-74.
- Kurahashi, T. und K. W. Yau (1994). "Olfactory transduction. Tale of an unusual chloride current." *Current biology : CB* **4**(3): 256-258.
- Kusch, J., V. Nache und K. Benndorf (2004). "Effects of permeating ions and cGMP on gating and conductance of rod-type cyclic nucleotide-gated (CNGA1) channels." *The Journal of physiology* **560**(Pt 3): 605-616.
- Lancet, D. (1986). "Vertebrate olfactory reception." *Annual review of neuroscience* **9**: 329-355.

- Leinders-Zufall, T., M. N. Rand, G. M. Shepherd, C. A. Greer und F. Zufall (1997). "Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**(11): 4136-4148.
- Li, J. und H. A. Lester (1999). "Single-channel kinetics of the rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel expressed in *Xenopus* oocytes." *Molecular pharmacology* **55**(5): 883-893.
- Liman, E. R. und L. B. Buck (1994). "A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cAMP." *Neuron* **13**(3): 611-621.
- Liu, D. T., G. R. Tibbs, P. Paoletti und S. A. Siegelbaum (1998). "Constraining ligand-binding site stoichiometry suggests that a cyclic nucleotide-gated channel is composed of two functional dimers." *Neuron* **21**(1): 235-248.
- Liu, D. T., G. R. Tibbs und S. A. Siegelbaum (1996). "Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function." *Neuron* **16**(5): 983-990.
- Liu, M., T. Y. Chen, B. Ahamed, J. Li und K. W. Yau (1994). "Calcium-calmodulin modulation of the olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel." *Science* **266**(5189): 1348-1354.
- Lowe, G. und G. H. Gold (1993). "Contribution of the ciliary cyclic nucleotide-gated conductance to olfactory transduction in the salamander." *The Journal of physiology* **462**: 175-196.
- Ludwig, J., T. Margalit, E. Eismann, D. Lancet und U. B. Kaupp (1990). "Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium." *FEBS letters* **270**(1-2): 24-29.
- Lynch, J. W. (1999). "Rectification of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel by intracellular polyamines." *The Journal of membrane biology* **170**(3): 213-227.
- Marunaka, Y., A. Ohara, P. Matsumoto und D. C. Eaton (1991). "Cyclic GMP-activated channel activity in renal epithelial cells (A6)." *Biochimica et biophysica acta* **1070**(1): 152-156.

- Menini, A. (1999). "Calcium signalling and regulation in olfactory neurons." *Current opinion in neurobiology* **9**(4): 419-426.
- Milescu, L. S., T. Yamanishi, K. Ptak, M. Z. Mogri und J. C. Smith (2008). "Real-time kinetic modeling of voltage-gated ion channels using dynamic clamp." *Biophysical journal* **95**(1): 66-87.
- Molday, L. L., N. J. Cook, U. B. Kaupp und R. S. Molday (1990). "The cGMP-gated cation channel of bovine rod photoreceptor cells is associated with a 240-kDa protein exhibiting immunochemical cross-reactivity with spectrin." *The Journal of biological chemistry* **265**(30): 18690-18695.
- Molday, R. S. (1996). "Calmodulin regulation of cyclic-nucleotide-gated channels." *Current opinion in neurobiology* **6**(4): 445-452.
- Munger, S. D., A. P. Lane, H. Zhong, T. Leinders-Zufall, K. W. Yau, F. Zufall und R. R. Reed (2001). "Central role of the CNGA4 channel subunit in Ca²⁺-calmodulin-dependent odor adaptation." *Science* **294**(5549): 2172-2175.
- Nache, V., E. Schulz, T. Zimmer, J. Kusch, C. Biskup, R. Koopmann, V. Hagen und K. Benndorf (2005). "Activation of olfactory-type cyclic nucleotide-gated channels is highly cooperative." *The Journal of physiology* **569**(Pt 1): 91-102.
- Nakamura, T. und G. H. Gold (1987). "A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia." *Nature* **325**(6103): 442-444.
- Nakamura, T., K. Tsuru und S. Miyamoto (1994). "Regulation of Ca²⁺ concentration by second messengers in newt olfactory receptor cell." *Neuroscience letters* **171**(1-2): 197-200.
- Nakatani, K. und K. W. Yau (1989). "Sodium-dependent calcium extrusion and sensitivity regulation in retinal cones of the salamander." *The Journal of physiology* **409**: 525-548.
- Opsahl, L. R. und W. W. Webb (1994). "Lipid-glass adhesion in giga-sealed patch-clamped membranes." *Biophysical journal* **66**(1): 75-79.
- Park, C. S. und R. MacKinnon (1995). "Divalent cation selectivity in a cyclic nucleotide-gated ion channel." *Biochemistry* **34**(41): 13328-13333.

- Perry, R. J. und P. A. McNaughton (1991). "Response properties of cones from the retina of the tiger salamander." *The Journal of physiology* **433**: 561-587.
- Picones, A. und J. I. Korenbrot (1992). "Permeation and interaction of monovalent cations with the cGMP-gated channel of cone photoreceptors." *The Journal of general physiology* **100**(4): 647-673.
- Picones, A. und J. I. Korenbrot (1995). "Permeability and interaction of Ca^{2+} with cGMP-gated ion channels differ in retinal rod and cone photoreceptors." *Biophysical journal* **69**(1): 120-127.
- Pifferi, S., A. Boccaccio und A. Menini (2006). "Cyclic nucleotide-gated ion channels in sensory transduction." *FEBS letters* **580**(12): 2853-2859.
- Qin, F. (2004). "Restoration of single-channel currents using the segmental k-means method based on hidden Markov modeling." *Biophysical journal* **86**(3): 1488-1501.
- Qin, F., A. Auerbach und F. Sachs (1996). "Estimating single-channel kinetic parameters from idealized patch-clamp data containing missed events." *Biophysical journal* **70**(1): 264-280.
- Qin, F., A. Auerbach und F. Sachs (1997). "Maximum likelihood estimation of aggregated Markov processes." *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **264**(1380): 375-383.
- Qin, F., A. Auerbach und F. Sachs (2000). "A direct optimization approach to hidden Markov modeling for single channel kinetics." *Biophysical journal* **79**(4): 1915-1927.
- Qin, F., A. Auerbach und F. Sachs (2000). "Hidden Markov modeling for single channel kinetics with filtering and correlated noise." *Biophysical journal* **79**(4): 1928-1944.
- Reed, R. R. (1992). "Signaling pathways in odorant detection." *Neuron* **8**(2): 205-209.
- Richards, M. J. und S. E. Gordon (2000). "Cooperativity and cooperation in cyclic nucleotide-gated ion channels." *Biochemistry* **39**(46): 14003-14011.
- Root, M. J. und R. MacKinnon (1993). "Identification of an external divalent cation-binding site in the pore of a cGMP-activated channel." *Neuron* **11**(3): 459-466.

- Root, M. J. und R. MacKinnon (1994). "Two identical noninteracting sites in an ion channel revealed by proton transfer." *Science* **265**(5180): 1852-1856.
- Ruiz, M., R. L. Brown, Y. He, T. L. Haley und J. W. Karpen (1999). "The single-channel dose-response relation is consistently steep for rod cyclic nucleotide-gated channels: implications for the interpretation of macroscopic dose-response relations." *Biochemistry* **38**(33): 10642-10648.
- Ruiz, M. und J. W. Karpen (1999). "Opening mechanism of a cyclic nucleotide-gated channel based on analysis of single channels locked in each liganded state." *The Journal of general physiology* **113**(6): 873-895.
- Ruiz, M. L. und J. W. Karpen (1997). "Single cyclic nucleotide-gated channels locked in different ligand-bound states." *Nature* **389**(6649): 389-392.
- Sautter, A., X. Zong, F. Hofmann und M. Biel (1998). "An isoform of the rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel beta subunit expressed in olfactory neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(8): 4696-4701.
- Schild, D. und D. Restrepo (1998). "Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells." *Physiological reviews* **78**(2): 429-466.
- Scott, K. und C. Zuker (1998). "TRP, TRPL and trouble in photoreceptor cells." *Current opinion in neurobiology* **8**(3): 383-388.
- Scott, S. P., J. Cummings, J. C. Joe und J. C. Tanaka (2000). "Mutating three residues in the bovine rod cyclic nucleotide-activated channel can switch a nucleotide from inactive to active." *Biophysical journal* **78**(5): 2321-2333.
- Scott, S. P., R. W. Harrison, I. T. Weber und J. C. Tanaka (1996). "Predicted ligand interactions of 3'5'-cyclic nucleotide-gated channel binding sites: comparison of retina and olfactory binding site models." *Protein engineering* **9**(4): 333-344.
- Scott, S. P. und J. C. Tanaka (1995). "Molecular interactions of 3',5'-cyclic purine analogues with the binding site of retinal rod ion channels." *Biochemistry* **34**(7): 2338-2347.

- Shapiro, M. S. und W. N. Zagotta (1998). "Stoichiometry and arrangement of heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated ion channels." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(24): 14546-14551.
- Shapiro, M. S. und W. N. Zagotta (2000). "Structural basis for ligand selectivity of heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels." *Biophysical journal* **78**(5): 2307-2320.
- Sigworth, F. J. (1985). "Open channel noise. I. Noise in acetylcholine receptor currents suggests conformational fluctuations." *Biophysical journal* **47**(5): 709-720.
- Sigworth, F. J. (1986). "Open channel noise. II. A test for coupling between current fluctuations and conformational transitions in the acetylcholine receptor." *Biophysical journal* **49**(5): 1041-1046.
- Sigworth, F. J. und S. M. Sine (1987). "Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms." *Biophysical journal* **52**(6): 1047-1054.
- Song, L. und K. L. Magleby (1994). "Testing for microscopic reversibility in the gating of maxi K⁺ channels using two-dimensional dwell-time distributions." *Biophysical journal* **67**(1): 91-104.
- Song, Y., K. D. Cygnar, B. Sagdullaev, M. Valley, S. Hirsh, A. Stephan, J. Reiser und H. Zhao (2008). "Olfactory CNG channel desensitization by Ca²⁺/CaM via the B1b subunit affects response termination but not sensitivity to recurring stimulation." *Neuron* **58**(3): 374-386.
- Steinberg, I. Z. (1987). "Frequencies of paired open-closed durations of ion channels. Method of evaluation from single-channel recordings." *Biophysical journal* **52**(1): 47-55.
- Stryer, L. (1986). "Cyclic GMP cascade of vision." *Annual review of neuroscience* **9**: 87-119.
- Tanaka, J. C. und R. E. Furman (1993). "Divalent effects on cGMP-activated currents in excised patches from amphibian photoreceptors." *The Journal of membrane biology* **131**(3): 245-256.

Tibbs, G. R., E. H. Goulding und S. A. Siegelbaum (1997). "Allosteric activation and tuning of ligand efficacy in cyclic-nucleotide-gated channels." *Nature* **386**(6625): 612-615.

Tibbs, G. R., D. T. Liu, B. G. Leybold und S. A. Siegelbaum (1998). "A state-independent interaction between ligand and a conserved arginine residue in cyclic nucleotide-gated channels reveals a functional polarity of the cyclic nucleotide binding site." *The Journal of biological chemistry* **273**(8): 4497-4505.

Trankner, D., H. Jagle, S. Kohl, E. Apfelstedt-Sylla, L. T. Sharpe, U. B. Kaupp, E. Zrenner, R. Seifert und B. Wissinger (2004). "Molecular basis of an inherited form of incomplete achromatopsia." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**(1): 138-147.

Varnum, M. D., K. D. Black und W. N. Zagotta (1995). "Molecular mechanism for ligand discrimination of cyclic nucleotide-gated channels." *Neuron* **15**(3): 619-625.

Varnum, M. D. und W. N. Zagotta (1997). "Interdomain interactions underlying activation of cyclic nucleotide-gated channels." *Science* **278**(5335): 110-113.

Waldeck, C., K. Vocke, N. Ungerer, S. Frings und F. Mohrlen (2009). "Activation and desensitization of the olfactory cAMP-gated transduction channel: identification of functional modules." *The Journal of general physiology* **134**(5): 397-408.

Weber, I. T., J. B. Shabb und J. D. Corbin (1989). "Predicted structures of the cGMP binding domains of the cGMP-dependent protein kinase: a key alanine/threonine difference in evolutionary divergence of cAMP and cGMP binding sites." *Biochemistry* **28**(14): 6122-6127.

Weitz, D., M. Zoche, F. Muller, M. Beyermann, H. G. Korschen, U. B. Kaupp und K. W. Koch (1998). "Calmodulin controls the rod photoreceptor CNG channel through an unconventional binding site in the N-terminus of the beta-subunit." *The EMBO journal* **17**(8): 2273-2284.

Weyand, I., M. Godde, S. Frings, J. Weiner, F. Muller, W. Altenhofen, H. Hatt und U. B. Kaupp (1994). "Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm." *Nature* **368**(6474): 859-863.

- Yau, K. W. und D. A. Baylor (1989). "Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells." *Annual review of neuroscience* **12**: 289-327.
- Yau, K. W. und K. Nakatani (1985). "Light-suppressible, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment." *Nature* **317**(6034): 252-255.
- Young, E. C. und N. Krougliak (2004). "Distinct structural determinants of efficacy and sensitivity in the ligand-binding domain of cyclic nucleotide-gated channels." *The Journal of biological chemistry* **279**(5): 3553-3562.
- Young, E. C., D. M. Sciubba und S. A. Siegelbaum (2001). "Efficient coupling of ligand binding to channel opening by the binding domain of a modulatory (beta) subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel." *The Journal of general physiology* **118**(5): 523-546.
- Zagotta, W. N. und S. A. Siegelbaum (1996). "Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels." *Annual review of neuroscience* **19**: 235-263.
- Zheng, J., M. D. Varnum und W. N. Zagotta (2003). "Disruption of an intersubunit interaction underlies Ca²⁺-calmodulin modulation of cyclic nucleotide-gated channels." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(22): 8167-8175.
- Zheng, J. und W. N. Zagotta (2004). "Stoichiometry and assembly of olfactory cyclic nucleotide-gated channels." *Neuron* **42**(3): 411-421.
- Zimmerman, A. L. (1995). "Cyclic nucleotide gated channels." *Current opinion in neurobiology* **5**(3): 296-303.
- Zimmerman, A. L. und D. A. Baylor (1986). "Cyclic GMP-sensitive conductance of retinal rods consists of aqueous pores." *Nature* **321**(6065): 70-72.
- Zong, X., H. Zucker, F. Hofmann und M. Biel (1998). "Three amino acids in the C-linker are major determinants of gating in cyclic nucleotide-gated channels." *The EMBO journal* **17**(2): 353-362.
- Zufall, F. und S. Firestein (1993). "Divalent cations block the cyclic nucleotide-gated channel of olfactory receptor neurons." *Journal of neurophysiology* **69**(5): 1758-1768.

Zufall, F., S. Firestein und G. M. Shepherd (1994). "Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons." *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **23**: 577-607.

Abkürzungsverzeichnis

CNG-Kanal	zyklischer Nukleotid-gesteuerter (cyclic nucleotide gated) Kanal
CNGA2-Kanal	homomerer CNG-Kanal aus CNGA2-Untereinheiten
CNGA2:A4:B1b-Kanal	heteromerer CNG-Kanal des olfaktorischen Sensoreurons
cGMP	zyklisches Guanosin-3,5-monophosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-3,5-monophosphat
cRNA	komplementäre RNA (engl. complementary RNA)CNG
CN	zyklische Nucleotide
CNBD	zyklische Nukleotide Bindedomäne
Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ , Ni^{2+}	Calcium-, Chlorid-, Natrium- und Nitrid-Ionen
CaM	Calmodulin
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid
EC_{50}	Konzentration bei der der Kanal halbmaximal aktiviert ist
H	Hill-Koeffizient
I	Strom in pA
P_{open}	Offenwahrscheinlichkeit

Lebenslauf

Name: Melanie Eberhard

Geb. am: 30.04.1982

In: Erfurt

Werdegang:

1988 – 1992 Grundschole 34 in Erfurt

1992 – 1998 Regelschole 3 in Erfurt

1998 – 2001 Gutenberg Gymnasium in Erfurt

Abitur (Note 2,0)

2001 – 2001 freiwilliges soziales Jahr

2002 – 2004 Grundstudium an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena,
Fachrichtung Biologie (Diplom)

2004 Vordiplom (Note 1,7)

2004 – 2008 Hauptstudium, Hauptfach: Genetik, Nebenfächer:
Pharmakologie und Anthropologie

2008 Abschluss Diplombiologie (Note 2,0)

2008 – 2011 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Herz- und
Kreislauf Physiologie der Friedrich-Schiller-Universität in
Jena

Anfertigung der Promotion mit dem Thema „Schaltverhalten
homo- und heterotetramerer olfaktorischer CNG-Kanäle“

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Herz- und Kreislauf Physiologie der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

Ich danke Prof. Dr. Klaus Benndorf (Direktor des Institutes für Herz- und Kreislauf Physiologie) für die gute Betreuung der Arbeit und dafür, dass er immer Zeit zur Beantwortung von Frage zum Thema der Arbeit hatte. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Dahse (Lehrstuhl für Biophysik) für die Betreuung seitens der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU-Jena und für sein Interesse an der Arbeit.

Ich danke allen Mitgliedern des Institutes für Ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei Fragen oder Problemen. Mein besonderer Dank gilt hierbei Dr. Ralf Schmauder, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und unglaublich viel Geduld mit mir bei der Klärung von Fragen für die mathematischen Berechnung und Modellierung bewies. Außerdem möchte ich Dr. Jana Kusch und Dr. Vasilica Nache danken, die mir eine große Unterstützung bei methodischen Fragestellungen waren und mir mit Ihrem Wissen über CNG-Kanäle eine große Hilfe waren. Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitgliedern des Institutes, wie PD. Dr Thomas Zimmer, Karin Schoknecht, Sandra Bernhardt, Sonja Rabe und Birgit Tietsch.

Ich möchte mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die die ganze Zeit für mich da waren und mir sehr viel Zuversicht bei der Durchführung dieser Arbeit gegeben haben.